

Melanie Hofmann

Die Expression und Regulation des Wachstumsfaktors PlGF in humanen und murinen, vaskulären Endothelzellen *in vitro*

eingereicht als

BACHELORARBEIT

an der

HOCHSCHULE MITTWEIDA
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Fakultät
Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

angefertigt am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig

Mittweida
2010

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Regulation und Differenzierung des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung (HZI) Braunschweig unter der Leitung von Dr. Herbert A. Weich angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der ausgewiesenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mittweida, den 31. August 2010

Melanie Hofmann

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Aufbau der Plazenta	1
1.1.1 Der villöse Trophoblast und seine Differenzierung	1
1.2 Angiogenese	2
1.2.1 Angiogenese bei der Entstehung von Krebs	3
1.3 VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-System	3
1.3.1 VEGF Liganden-Familie	4
1.3.2 VEGF-Rezeptoren.....	5
1.4 Der <i>Placental Growth Factor</i> (PlGF)	7
1.4.1 PlGF-Syntheseorte	8
1.4.2 Mögliche Stimulatoren der PlGF-Expression	9
1.5 Ziel dieser Arbeit	10
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Materialliste	11
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Zusätze	11
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	12
2.1.4 Proteine und Enzyme.....	14
2.1.5 Antikörper.....	14
2.1.6 Zellkulturmaterial	14
2.1.7 Zellbiologisch wirksame Substanzen	15
2.1.8 Synthetische Oligonucleotide	16
2.1.9 Kits	16
2.2 Primäre Zellkulturen.....	16
2.2.1 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).....	16
2.2.2 Susanne Norgall-Microvascular Endothelial Cells (SNO-MECs).....	17
2.3 Zellkultur.....	17
2.3.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	17
2.3.2 Medienwechsel.....	18
2.3.3 Subkultivierung von Zellen	18
2.3.4 Zellzählung.....	18
2.4 <i>In-vitro</i> Stimulationsversuche	19
2.4.1 PMA-Stimulation.....	19
2.4.2 TNF- α -Stimulation	20
2.4.3 FCS Stimulation.....	20
2.4.4 ECGF/ECGS-Stimulation.....	20
2.5 Nachweismethoden	20
2.5.1 Sandwich-ELISA.....	20
2.5.2 RNA-Isolation	22
2.5.3 cDNA-Synthese	23

2.5.4	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
2.5.5	Lysatherstellung und BCA-Proteinbestimmung.....	26
2.5.6	Western Blot.....	26
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Nachweis des PlGF Proteins in Lysaten humaner Plazenta.....	30
3.1.1	Nachweis über die Western Blot – Methode	30
3.1.2	Quantifizierung mit Hilfe des PlGF Sandwich-ELISA	31
3.2	Untersuchung der PlGF Expression in Lysaten humaner Endothelzellen	32
3.3	Quantifizierung der PlGF-Expression in Zellüberständen von humanen und murinen Endothelzellen.....	33
3.3.1	PlGF-Expression in Zellüberständen von <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (HUVECs).....	33
3.3.2	PlGF-Expression in Zellüberständen von End C57Bl/6, SNO-MECs und SNO-MEC Subclonen	34
3.4	Stimulation der PlGF-Expression humaner und muriner Endothelzellen <i>in vitro</i>	35
3.4.1	Konzentrations- und zeitabhängige Stimulation mit PMA	36
3.4.2	Konzentrationsabhängige Stimulation mit TNF- α	37
3.4.3	Konzentrationsabhängige Stimulation mit FCS	39
3.4.4	Konzentrationsabhängige Stimulation muriner Endothelzellen mit ECGF.....	40
3.4.5	Konzentrationsabhängige Stimualtion humaner Endothelzellen mit ECGS	41
4	DISKUSSION	42
4.1	Vergleich der PlGF-Expressionsrate zwischen Synzytiotrophoblasten der Plazenta und humanen Endothelzellen	42
4.2	Vergleich der PlGF-Expressionsrate zwischen humanen und murinen Endothelzellen.....	43
4.3	Einfluss von ECGF/ECGS auf die PlGF-Expressionsrate	44
4.4	Einfluss der PKC-Aktivierung durch PMA auf die PlGF-Expression.....	44
4.5	Abhängigkeit der PlGF-Expression von TNF- α	45
4.6	Inhibierung der PlGF-Expression durch FCS	45
4.7	Ausblick	46
5	ZUSAMMENFASSUNG	48
	LITERATURVERZEICHNIS.....	49
	DANKSAGUNG	53

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Schematischer Aufbau der humanen Plazenta.....	1
Abb. 1.2	Schematischer Ablauf der Angiogenese	3
Abb. 1.3	Allgemeine Aktivierung eines Tyrosinkinase-Rezeptors	4
Abb. 1.4	Übersicht der VEGF-Liganden und ihrer Rezeptoren.....	5
Abb. 1.5	Signalkaskaden in Abhängigkeit von der Phosphorylierung der Tyrosine im Tyrosinkinasebereich	6
Abb. 1.6	Strukturmodell des PlGF-1 und schematische Darstellung der Rezeptorbindungen des PlGF, VEGF-A und VEGF-B	7
Abb. 2.1	Schematische Darstellung eines spezifischen Sandwich-ELISA	21
Abb. 2.2	Detektion von Proteinen auf Membranen	28
Abb. 3.1	Western Blot mit Lysaten aus humaner Plazenta.....	30
Abb. 3.2	PlGF-Konzentrationen in humanen Plazenta-Lysaten	31
Abb. 3.3	Vergleich der PlGF-Konzentrationen zwischen Plazenta- und HUVEC-Lysat	32
Abb. 3.4	PlGF-Zeitkinetik in HUVEC, p7.....	33
Abb. 3.5	PlGF Zeitkinetik in SNO-MECs, p24	34
Abb. 3.6	Untersuchung der PlGF-Genaktivität mittels PCR	35
Abb. 3.7	PlGF-Konzentrationsbestimmung in verschiedenen SNO-MEC Subklonen.....	35
Abb. 3.8	PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur Zeit unter Einfluss von PMA.	36
Abb. 3.9	PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur PMA-Konzentration	37
Abb. 3.10	PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur PMA-Konzentration	37
Abb. 3.11	PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur TNF- α -Konzentration	38
Abb. 3.12	PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur TNF- α -Konzentration	38
Abb. 3.13	PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur FCS-Konzentration	39
Abb. 3.14	PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur FCS-Konzentration	40
Abb. 3.15	PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur ECGF-Konzentration	40
Abb. 3.16	PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur ECGS-Konzentration	41

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1	Expression von PlGF in Geweben von Mensch und Maus	8
Tab. 2.1	Herkunft der eingesetzten Geräte	11
Tab. 2.2	Herkunft der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Zusätze	11
Tab. 2.3	Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	12
Tab. 2.4	Herkunft der eingesetzten Proteine und Enzyme.....	14
Tab. 2.5	Übersicht über die Herkunft der verwendeten Antikörper	14
Tab. 2.6	Übersicht der Verwendeten Zellkultur-Medien.....	15
Tab. 2.7	Übersicht der eingesetzten Zellkulturen	15
Tab. 2.8	Herkunft der verwendeten zellbiologisch wirksamen Substanzen	15
Tab. 2.9	Übersicht der eingesetzten Primer	16
Tab. 2.10	Herkunft der verwendeten Kits	16
Tab. 2.11	PCR-Reaktionsansatz.....	25
Tab. 2.12	Übersicht der eingesetzten PCR-Programme	25
Tab. 2.13	Primer für die PCR.....	25

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BAEC	Rinderaortaendothelzellen
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt
BSA	Bovine Serum Albumin
ca	circa
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
DAG	Diacylglycerine
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECGF	<i>endothelial cell growth factor</i>
ECGS	<i>endothelial cell growth supplement</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>endothelial growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunsorbent assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Flk-1	<i>fetal liver kinase-1</i>
Flt-1	<i>fms-like tyrosinkinase-1</i>
for	<i>forward</i>
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IgG	Immunglobulin G
KDR	<i>kinase insert domain containing receptor</i>
Min	Minute
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>

nb	nicht beschrieben
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
NJ	New Jersey
NP-1	Neurophilin-1
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS	Sodiumperborate
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PKC	Proteinkinase C
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PMA	<i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	<i>reverse</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTase	<i>reverse transcriptase</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
Sek	Sekunde
sFlt-1	lösliche fms-like Tyrosinkinase-1
SNO-MEC	Susanne Norgall- <i>microvascular endothelial cells</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	Tris- <i>buffered</i> Saline
TBST	Tris- <i>buffered</i> Saline Tween®20
TGF- β	<i>transforming growth factor – beta</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	Unter anderem
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
VEGFR-1/2/3	<i>vascular endothelial growth factor receptor-1/2/3</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Aufbau der Plazenta

Die Plazenta ist ein nur während der Schwangerschaft auftretendes Gewebe im Uterus. Dieses wird aus fetalem (Chorion) und maternalem (Endometrium) Gewebe gebildet. Die humane Plazenta ist im ausgereiften Zustand etwa 600g schwer und hat einen Durchmesser von 15 bis 20 cm. Zwischen dem Chorion und der basalen Dezidua, die auch als maternale Basalplatte bezeichnet wird, befindet sich der intervillöse Raum. Dieser ist mit maternalem Blut gefüllt und wird von der Dezidua aus durch bindegewebige Septen in Kotyledonen unterteilt. Die Kotyledonen bestehen aus ca. 40 Zottenbäumen. Aufgebaut sind diese Zotten aus fetalem Bindegewebe und innenliegenden Blutgefäßen und werden von Zytotrophoblastenzellen umhüllt. Durch diese Zytotrophoblastenschicht erfolgt der Austausch von Nährstoffen, Gasen und die Produktion von Hormonen. Der direkte Kontakt von mütterlichem und fetalem Blut wird jedoch nie hergestellt (s. Abb. 1.1).

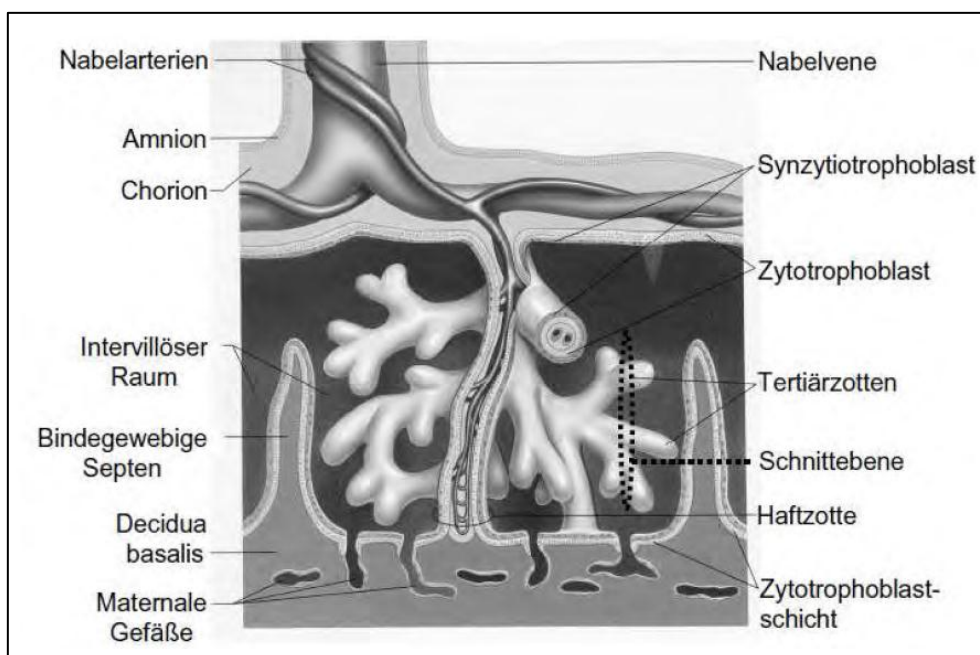


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau der humanen Plazenta. (aus Cochard et al., 2002)

1.1.1 Der villöse Trophoblast und seine Differenzierung

Der villöse Trophoblast ist die äußerste Zellschicht des in der menschlichen Plazenta vorkommenden Zottenbaumes. Dieser besteht aus einer Lage proliferierender Stammzellen mit direktem Kontakt zu dem Zytotrophoblasten und einer zweiten Lage, den multinuklearen Synzytiotrophoblasten. Diese

Lage besitzt keine laterale Zellgrenze, denn der Synzytiotrophoblast entsteht nur durch Fusion von Zytotrophoblastenzellen (Huppertz, 2005). Nur durch ständige Fusionen kann der Synzytiotrophoblast aufrechterhalten werden, da dieser aufgrund seines hohen Differenzierungsgrades die Fähigkeit zur Teilung und Regeneration verloren hat. Der villöse Trophoblast agiert wie ein klassisches Epithel: Altes Zellmaterial wird in sogenannten Synzytialknoten von der Plazenta abgegeben, die dann ins mütterliche Blut übergehen und von der Mutter entsorgt werden (Huppertz, 2005). Somit bildet der Trophoblast die strukturelle Grenze zwischen dem mütterlichen und dem fetalen Kompartiment.

1.2 Angiogenese

Angiogenese bezeichnet die Entstehung neuer Blutgefäße (Kapillaren), überwiegend durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem. Hiervon ist die Vaskulogenese zu unterscheiden, der primären Ausbildung des Gefäßsystems während der Embryonalzeit. Die Angiogenese ist während der Embryonalperiode für die Entwicklung des Embryos von großer Bedeutung. Beim ausgereiften Individuum tritt sie vor allem dann auf, wenn ein vermehrtes Blutgefäßwachstum benötigt wird, z.B. bei der Wundheilung oder dem Aufbau der Uterusschleimhaut (Volkman, 2004).

Als Voraussetzung für den koordinierten Ablauf einer Gefäßneubildung müssen Zellen, lösliche Faktoren und die extrazelluläre Matrix in komplexer Weise zusammenwirken (Berse, 2007). Die Wachstumsfaktoren binden dann an spezifische Rezeptoren, welche sich auf der Oberfläche von Endothelzellen befinden, die bereits Vorläufer-Blutgefäße auskleiden. Endothelzellen sind spezialisierte, flache Zellen, welche die Innenseite der Blutgefäße auskleiden. Sie können Gefäße bilden und hohen Blutdrücken in den Gefäßen standhalten. Zur Angiogenese kommt es durch die Aktivierung der Endothelzellen, wodurch diese ihren Zellkontakt verlieren und Proteasen sekretieren, welche die Basalmembran abbauen. Die Basalmembran ist die Grenze zwischen Endothelzellschicht und der vaskulären glatten Muskelschicht. Die Endothelzellen beginnen zu proliferieren und wandern entlang des Konzentrationsgefälles durch die aufgelöste Basalmembran. Die Blutgefäße wachsen somit in den Tumor und es entsteht somit ein neuer Kreislauf, so dass das Blut zirkulieren kann. Um zu migrieren, zu proliferieren und die Basalmembran sowie die extrazelluläre Matrix abzubauen, verändern Endothelzellen die Struktur ihres Zytoskelletes, exprimieren spezifische Oberflächenmoleküle und bilden proteolytische Enzyme.

Bei der Regulation der Angiogenese spielen die Faktoren und Rezeptoren eine äußerst wichtige Rolle. Bei einer falschen Regulation in der Expression der Liganden und Rezeptoren kann es zu verschiedenen Krankheitsbildern, wie Arteriosklerose, Bluthochdruck, Tumorwachstum und Präeklampsie kommen. Eine Signalkaskade, mit dem Ziel die Regulation und Sekretion von verschiedenen proangi-

ogenen Wachstumsfaktoren (wie z.B. VEGF, PlGF, Ang1, Zytokine) zu erhöhen, die dann in der Umgebung abgegeben werden, wird z.B. durch eine lokale Hypoxie erzeugt. Wenn das Verständnis über die Expressionsregulation und Funktion der Gene für die Liganden und Rezeptoren verbessert wird, können neue Ansätze zur Therapie und Medikamentenentwicklung entwickelt werden (Carmeliet, 2007).

1.2.1 Angiogenese bei der Entstehung von Krebs

Im Gewebeverband benötigen menschliche Zellen zu ihrer Versorgung Sauerstoff und Nährstoffe und können deshalb nur in einem Umkreis von 100-200 μm von Blutgefäßen überleben. Bei den meisten soliden Tumoren tritt deshalb bei einer Größe von 3-5 mm^2 ein Wachstumsstillstand ein, da die Versorgung der Tumorzellen durch Diffusion nicht mehr ausreicht. Durch den Anschluss an das Blutgefäßsystem sind das weitere Wachstum des Tumors und eventuelle Metastasierung möglich.

Bei der Angiogenese in Tumoren werden dann Endothelzellen vorhandener Blutgefäße aktiviert. Diese teilen sich und produzieren proteolytische Enzyme. Nach der Proliferation migrieren die Endothelzellen in Richtung des Tumors und schließen ihn an das Blutgefäßsystem an (s. Abb. 1.2).

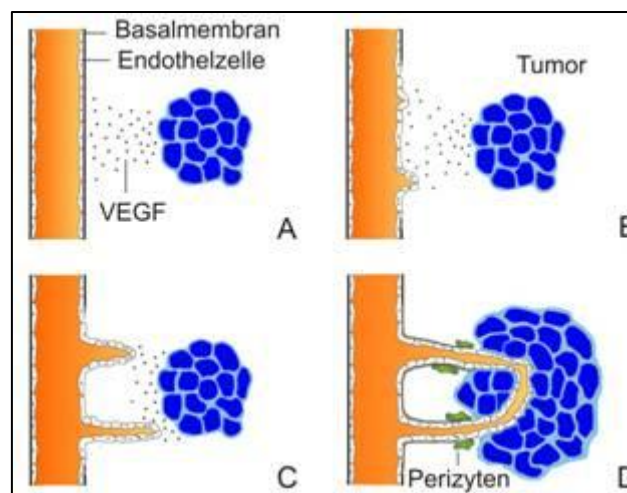


Abb. 1.2 Schematischer Ablauf der Angiogenese. (A) Aktivierung der Endothelzellen durch proangiogene Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) (B) Abbau der Basalmembran der Blutgefäße durch Proteinasen (C) Migration und Proliferation endothelialer Zellen zum angiogenen Reiz hin (D) Aufbau einer Basalmembran um neugebildete Blutgefäße und Verbindung der neuen Blutgefäße (aus Berse, 2005)

1.3 VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-System

Tyrosinkinasen sind eine Gruppe von Proteinen aus der Familie der Proteinkinasen, deren Aufgabe die reversible Übertragung eines Phosphatrestes auf die Hydroxygruppe der Aminosäure Tyrosin

eines anderen Proteins ist. Dadurch wird die Aktivität des Zielproteins beeinflusst, weshalb Tyrosinkinasen als Teil von Rezeptorsystemen einen wichtigen Beitrag zur Signalübertragung leisten. Außerdem bilden Tyrosinkinasen den intrazellulären Teil des Tyrosinkinase-Rezeptorsystems, über das beispielsweise Signale von Wachstumsfaktoren weitergegeben werden.

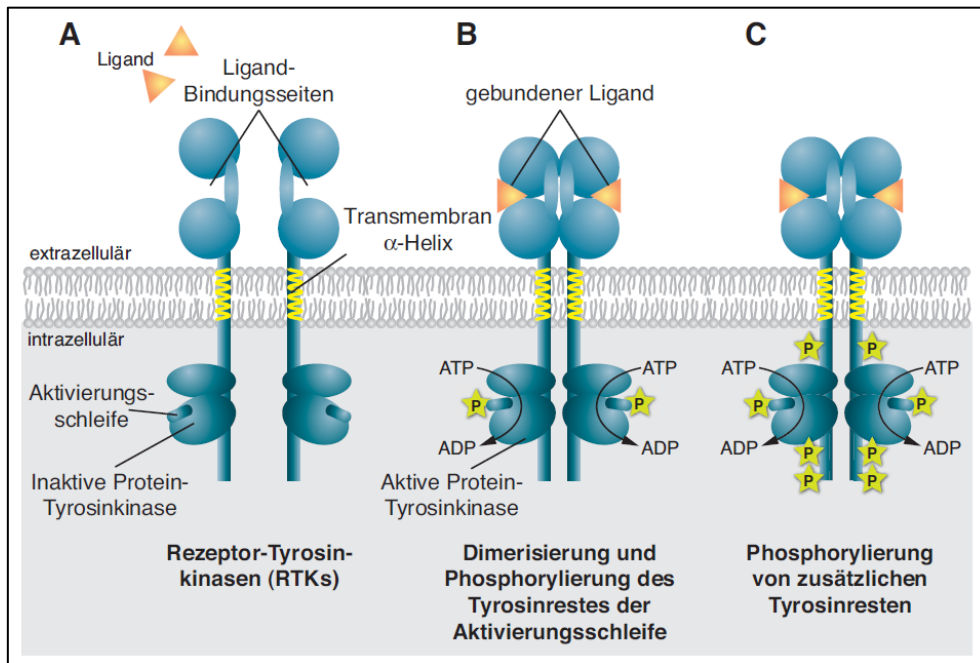


Abb. 1.3 Allgemeine Aktivierung eines Tyrosinkinase-Rezeptors. (A) Der Ligand bindet an die Rezeptor-Tyrosinkinase, (B) wodurch es zur Homo- oder Hetero-Dimerisierung und zur Phosphorylierung des Tyrosinrestes kommt. Dadurch wird die Protein-Tyrosinkinase unter Verbrauch von ATP aktiviert. (C) Es kommt zur Phosphorylierung weiterer Tyrosinreste, da eine Signalweiterleitung durch Phosphorylierungskaskaden erfolgt (aus Holm et al., 2008).

1.3.1 VEGF Liganden-Familie

Das VEGF/VEGFR-System (*vascular endothelial growth factor*) stellt das bisher am besten erforschte System in der Vaskulo- und Angiogeneseforschung dar. Die VEGFs zählen zu den Wachstumsfaktoren und den sogenannten Zytokinen, körpereigene hormonähnliche Botenstoffe, die auf Zellen eine aktivierende Wirkung ausüben und sie zu Teilung und Vermehrung anregen können. Identifiziert und sequenziert wurden die VEGF-Wachstumsfaktoren durch Leung et al. im Jahre 1989 (Berse, 2005). Es existieren fünf Liganden – VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D sowie PlGF – welche an drei Tyrosinkinase-Rezeptoren – VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 – binden, wo sie eine Rezeptordimerisierung und -aktivierung induzieren (s. Abb. 1.3). Die dadurch aktivierte Kaskade übermittelt Signale bis an den Zellkern und löst dort entsprechende Reaktionen aus (s. Abb. 1.5) (Mross, 2008). Zusätzlich können bestimmte Isoforme aus der VEGF-Familie an Neuophilin (NP)-1 und -2 binden, welche als Co-

Rezeptoren der drei Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 dienen und die Gefäßfunktionen regulieren, welche von VEGFR-2 und VEGFR-3 vermittelt werden. Zu diesen Gefäßfunktionen zählen die Angiogenese und Lymphangiogenese. Prozesse die entscheidend für das Tumorwachstum und die Metastasenbildung sind (Cao, 2009).

Man zählt die VEGFs zu einer strukturell verwandten Superfamilie von Wachstumsfaktoren, die auch den PDGF (*platelet-derived growth factor*), den PlGF (*placental growth factor*) sowie den TGF- β (*transforming growth factor beta*) umfassen. Die Mitglieder dieser Familie sind sekretierte, dimere Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 40 kDa. Jeweils zwei Monomere verbinden sich über vier Disulfidbrücken zu einem Dimer. Die VEGFs bevorzugen hierbei die Bildung von Homodimeren. Allerdings sind Heterodimere zwischen VEGF-A und PlGF, VEGF-A und VEGF-B sowie zwischen VEGF-C und VEGF-D beschrieben worden (Mross, 2008).

Zur Regulation der VEGF-Sekretion laufen in der Zelle komplexe Mechanismen ab. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Induktion der Transkription des VEGF-Gens durch Hypoxie (Berse, 2005), also einem Sauerstoffmangel im arteriellen Blut oder im Gewebe von Organismen, wodurch es zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (*hypoxia-inducible factor*) kommt.

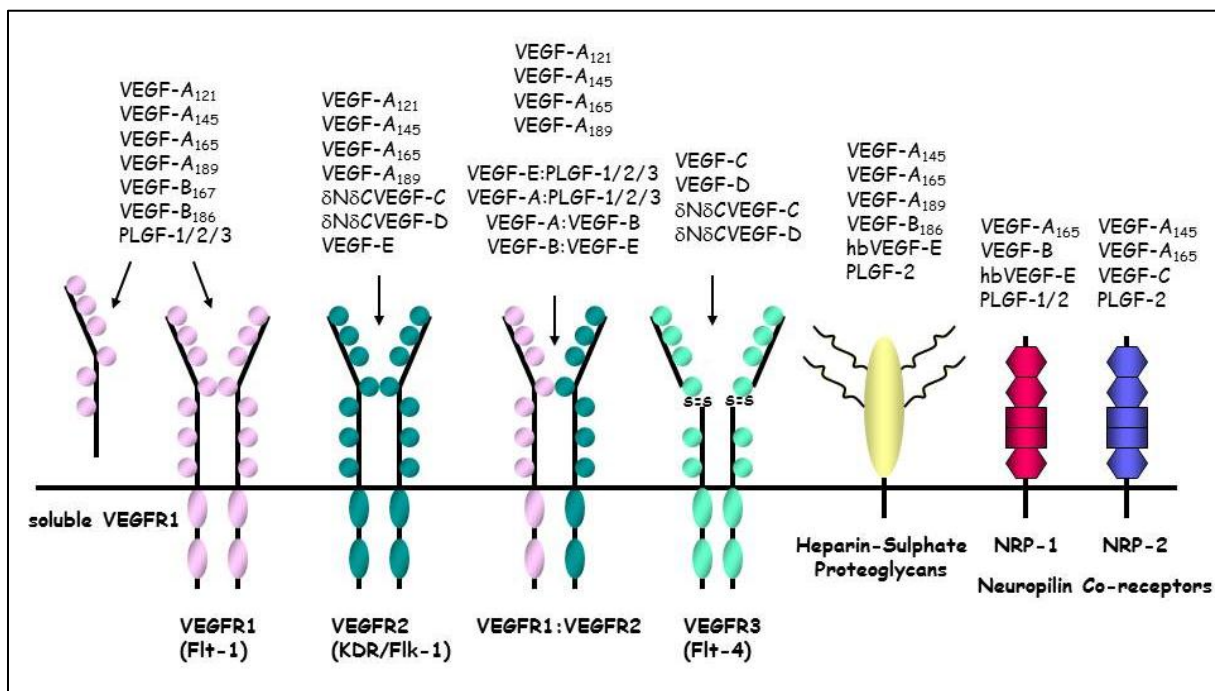


Abb. 1.4 Übersicht der VEGF-Liganden und ihrer Rezeptoren.

1.3.2 VEGF-Rezeptoren

Die VEGF-Rezeptoren sind Mitglieder der Rezeptor-Tyrosinkinase Familie. Bisher wurden hiervon drei (VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3) in den 1990er Jahren charakterisiert. VEGFR-1 entspricht dem Flt-1

(*fms-like receptor tyrosine kinase*), VEGFR-2 dem KDR (*kinase insert domain containing receptor*) oder dem Flk-1 (*fetal liver kinase-1*) in der Maus und VEGFR-3 dem Flt-4. Man findet diese drei Rezeptoren vorwiegend auf Blutgefäß-, Lymphgefäß- sowie Endothelzellen, jedoch wurde der VEGFR-1 auch auf Mamma-, Kolon- und Pankreaskarzinomzellen und Trophoblasten nachgewiesen, sowie VEGFR-1 und VEGFR-2 auch auf Monozyten, Megakaryozyten, hämatopoetischen Stammzellen und Mesangiumzellen der Niere. Die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 bestehen aus sieben Immunglobulin (Ig) ähnlichen extrazellulären Domänen, wobei beim VEGFR-3 die fünfte Ig-ähnliche Domäne durch eine Disulfidbrücke ersetzt ist. Die Bindung des Liganden erfolgt bei den VEGF-Rezeptoren in Höhe der zweiten und dritten Ig-ähnlichen Domäne. Die vierte Domäne vermittelt die Dimerisierung der Rezeptoren, welche für die Aktivierung der Rezeptoren notwendig ist. Die tyrosinhaltige Abschnitte der intrazellulären Kinase-Domäne können durch Phosphorylierung unterschiedliche Signalkaskaden initiieren, die dann über unterschiedliche Signaltransduktionswege ablaufen (s. Abb. 1.5) (Mross, 2008).

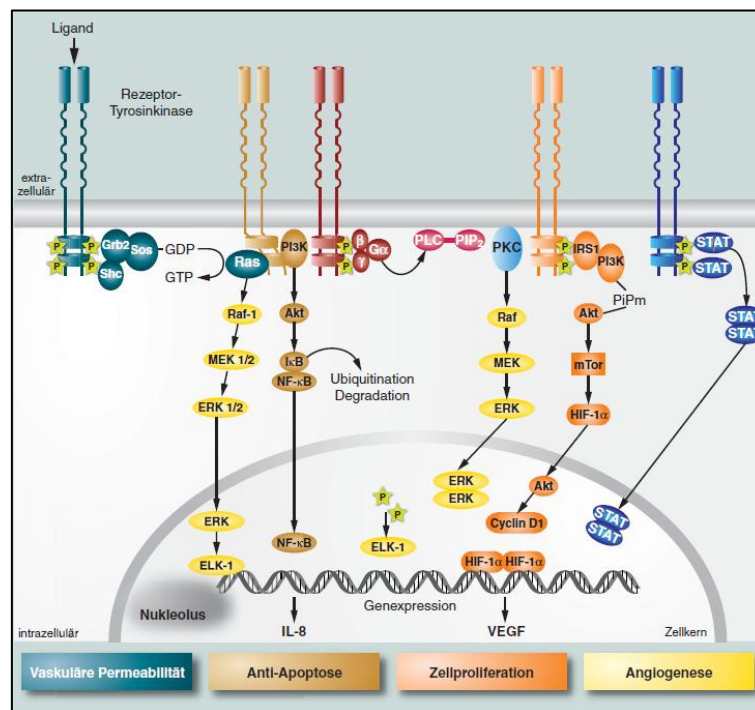


Abb. 1.5 Signalkaskaden in Abhängigkeit von der Phosphorylierung der Tyrosine im Tyrosinkinasebereich (aus Mross, 2008)

Durch solche Signalkaskaden kommt es u.a. zur Aktivierung des inaktiven PKCs (Proteinkinase C). Proteinkinasen sind Enzyme, die eine Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf Proteine katalysieren (Phosphorylierung). Durch die Aktivierung dieses PKCs ist dieses in der Lage, sich an die Zellmembran zu lagern und somit weitere Reaktionen für eine Zellantwort auszulösen (Koolmann, 1994). VEGFR-1 und VEGFR-2 sind bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Blutgefäßen beteiligt, während VEGFR-3 hauptsächlich in der Lymphangiogenese involviert ist (Olsson et al., 2006).

1.4 Der Placental Growth Factor (PlGF)

Die vorliegende Bachelorarbeit beschäftigt sich mit der Regulation der Genexpression des *placental growth factors* (PlGF) in Endothelzellen.

Der Wachstumsfaktor PlGF wurde durch Zufall von der Arbeitsgruppe um Graziella Persico entdeckt, deren eigentliches Ziel es war, die cDNA für Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus einer Plazenta-cDNA-Bibliothek zu klonieren (Hauser, 1992). Der menschliche PlGF zählt zur Gruppe der VEGFs, da er mit diesen nahe verwandt ist (Maglione et al., 1991). Vor allem in der cysteinreichen Domäne zeigen beide einen hohen Grad an Sequenzhomologie. VEGF-A ist in der Lage an den VEGF-Rezeptor 1 (Flt-1) als auch an den VEGF-Rezeptor-2 (Flk-1) zu binden, während PlGF nur mit dem VEGF-Rezeptor-1 eine Bindung eingeht (s. Abb. 1.6).

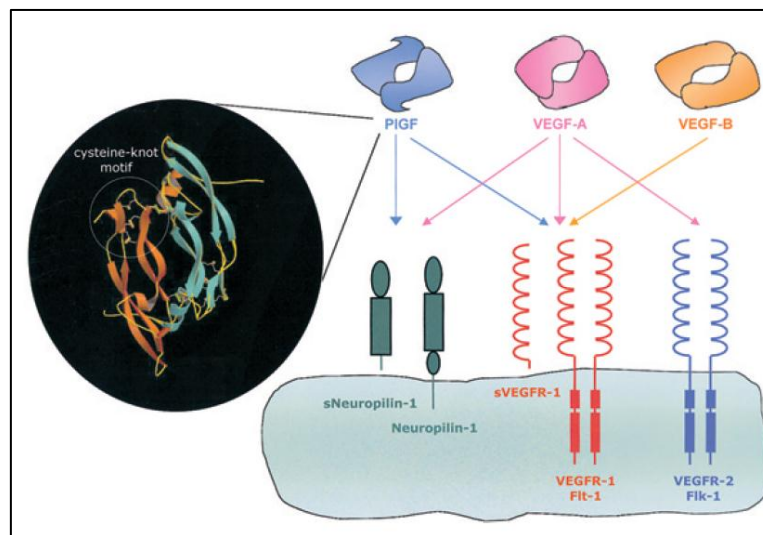


Abb. 1.6 Strukturmodell des PlGF-1 und schematische Darstellung der Rezeptorbindungen des PlGF, VEGF-A und VEGF-B. In dem schwarzem Kreis ist eine dreiminensionale Struktur des PlGF-1 abgebildet, wobei in in der weißen Markierung ein Cysteinmotiv zu sehen ist. VEGFR-1 und VEGFR-2 bestehen aus 7 Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembranregion und einer Tyrosinkinase-Domäne. VEGFR-1 existiert außerdem als lösliche Form (sVEGFR-1), welche aus den sieben immunglobulin-ähnlichen Domänen aufgebaut ist. Die VEGFR-1 Rezeptoren gehen Bindungen mit PlGF, VEGF-A und VEGF-B ein, wobei die Neurophilin-1 Rezeptoren ausschließlich an PlGF und der VEGFR-2 Rezeptor ausschließlich an VEGF-A binden. (aus De Falco et al., 2002)

Bislang sind drei unterschiedlich lange Unterformen des humanen PlGF beschrieben, welche alle von einem einzigen, differentiell gespleißten Gen (beim Menschen auf dem Chromosom Nummer 14) transkribiert werden. Yang et al. (Yang et al., 2003) entdeckte in HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) und den menschlichen Trophoblasten noch eine vierte Splicingform des PlGF-Gens. Die Sequenz dieser PlGF-4 Form entspricht der Sequenz von PlGF-3, mit dem Unterschied, dass PlGF-4 eine Heparinbindedomäne aufweist, welche bisher nur von PlGF-2 bekannt war. Der PlGF der Maus

ist auf dem Chromosom 12 kodiert und dem humanen PlGF-2 sehr ähnlich. Beide besitzen eine Heparinbindungsstelle.

VEGF wurde als wichtiger Regulator der physiologischen und pathologischen Angiogenese beschrieben (Folkman und Shing, 1992). Bereits das Fehlen eines einzigen VEGF-Allels verursacht Defekte in der Blutgefäßentstehung, die mit dem Überleben von Mäuseembryonen nicht vereinbar sind (Carmeliet et al., 1996). Das Maus-PlGF wird durch 7 Exons auf dem Chromosom 12 kodiert. Durch eine gezielte Zerstörung (targeted disruption) der Bereiche 3, 4 und 6 kann eine Inaktivierung des PlGF-Gens erreicht werden (Carmeliet, 2001). Mäuse, deren PlGF-Expression verhindert ist ($\text{PlGF}^{-/-}$), sind im Gegensatz zu $\text{VEGF}^{-/-}$ Tieren überlebensfähig. Ebenfalls konnte bisher kein Einfluss von PlGF auf die Vasculogenese oder die pränatale Angiogenese festgestellt werden (Carmeliet, 2001). Das PlGF generell das Wachstum von Gefäßen beeinflussen kann, ist in zahlreichen Studien der letzten drei bis vier Jahre nachgewiesen worden. Beispielsweise beschrieben Ziche et al. (Ziche et al., 1997), dass PlGF-1 *in vivo* (in der Kaninchenkornea) Angiogenese induzieren kann. *In vitro* wiesen sie eine stimulierende Wirkung auf Endothelzellmigration und -proliferation nach (Ziche et al., 1997).

1.4.1 PlGF-Syntheseorte

Tab. 1.1 Expression von PlGF in Geweben von Mensch und Maus. (+) PlGF wird exprimiert; (-) wird nicht exprimiert; (nb) nicht in der Quelle belegt (modifiziert nach: Persico et al., 1999)

	Mensch	Maus
Gehirn	+	-
Herz	+	-
Niere	-	-
Leber	-	-
Lunge	+	+
Bauchspeicheldrüse	-	-
Plazenta	+	+
Skelettmuskel	+	+
glatter Muskel	nb	-
Milz	nb	-
Hoden	nb	+
Schilddrüse	+	+

Die Expression von PlGF wurde schon in einigen Geweben und Organen untersucht (Persico et al., 1999). So wurde sie neben der Plazenta in Hirn, Herz und Lunge sowie im Skelettmuskel und in der Schilddrüse festgestellt. Dagegen konnte keine PlGF Expression in Niere, Leber und Pankreas, glattem Muskel, Milz und Hoden gefunden werden. In Endothelzellen humaner Umbilikalvenen (HUVEC's), in

Rinderaortaendothelzellen (BAEC's) und in Pulmonalarterienendothelzellen von Kälbern (CPA's) konnte ebenfalls PLGF Sezernierung nachgewiesen werden, in den (glatten) Gefäßmuskelzellen aber nicht (Persico et al., 1999) (s. Tab. 1.1).

1.4.2 Mögliche Stimulatoren der PlGF-Expression

1.4.2.1 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) gehört zu den Phorbolestern und aktiviert die Protein-Kinase C aufgrund seiner Strukturähnlichkeit zu deren natürlichem Ligand und Aktivator Diacylglycerine (DAG) (Nishizuka, 1984). Durch seine PKC-aktivierende Eigenschaft ist PMA außerdem ein Induktor für die VEGFR-1-Expression, der Ausschüttung des natürlichen Rezeptors von PlGF (Hornig et al., 2000).

1.4.2.2 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein Zytokin des Immunsystems, welches bei Entzündungsvorgängen beteiligt ist und hauptsächlich von Makrophagen, aber auch anderen Zelltypen, wie Lymphozyten und Endothelzellen, sezerniert wird. TNF- α kann Zellen zur Proliferation, Apoptose, Differenzierung und zur Ausschüttung anderer Zytokine anregen.

1.4.2.3 Fetal Calf Serum (FCS)

Fetales Kälberserum (FCS) ist der Hauptbestandteil vieler Nährmedien und wird aus dem Blut von Rinderfeten gewonnen. Es enthält eine Vielzahl von Proteinen, von denen heute noch nicht alle bekannt sind. Unter diesen Proteinen befinden sich unter anderem Wachstumsfaktoren die für die Kultur von Endothelzellen essenziell sind.

1.4.2.4 Endothelial Cell Growth Factor (ECGF)

ECGF (*endothelial cell growth factor*) ist ein Extrakt, welches aus dem Hirn von Rindern gewonnen wird. Es enthält Wachstumsfaktoren wie den *fibroblast growth factor* (FGF)-1 und FGF-2, weitere Bestandteile sind nicht genau geklärt. Für die Kultur von Endothelzellen ist ECGF ein wachstumsfördernder Bestandteil.

1.4.2.5 Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)

ECGS (*endothelial cell growth supplement*) ist stofflich identisch zu ECGF und ebenfalls ein wachstumsfördernder Bestandteil des Kulturmediums humaner Zellen.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, das Vorkommen und die Regulation des Proteins PlGF in Bezug auf Stimulation mit verschiedenen Faktoren und Mediatoren zu untersuchen. Hierzu existieren schon Vorarbeiten und Publikationen, welche jedoch hauptsächlich aus Northern Blots, RT-PCR und micro arrays stammen, d.h. sich auf Transkripte des Gens beziehen. Da bekannt ist, dass PlGF in sehr hohen Konzentrationen in den Trophoblasten der Plazenta exprimiert wird, soll die PlGF-Konzentration im Plazentagewebe genau quantifiziert und in ein Verhältnis zur Konzentration in Endothelzellen gesetzt werden.

Einen wichtigen Aspekt dieser Arbeit bildet somit die exakte Quantifizierung des Vorkommens von PlGF in den Überständen von murinen und humanen Endothelzellen, sowie die Regulation der PlGF-Expression dieser Zellen, mit Hilfe bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren. Um diese Quantifizierung erreichen zu können, wird ein hochempfindlicher Sandwich-ELISA eingesetzt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialliste

2.1.1 Geräte

Tab. 2.1 Herkunft der eingesetzten Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage, A200S	Sartorius, Göttingen
Trans Blot® SD Semi Dry	Bio-Rad, München
Brutschrank Labotec Inkubator C200	Bolo Tec, Göttingen
Multiscan 8-Kanal-Photometer Ex-405	Labsystem, Finnland
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Nanodrop Technologies, Wilmington (USA)
Pipetten, LABMATE (0,5-10; 2-20; 20-200; 100-1000 µl)	Abimed Analysen-Technik, Langenfeld
Sicherheitswerkbank, Herasafe HS12	Heraeus, Hanau
Thermocycler, TProfessional Basic 96	Biometra, Göttingen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zell-Counter, CASY-1	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge, 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, 5417C	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer, 5437	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresis Power Supply, PS 608	GibcoBRL, USA
Ultra Turrax T	Ika, Staufen

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Zusätze

Die Laborchemikalien wurden von folgenden Firmen in analysenreiner Qualität bezogen:

Tab. 2.2 Herkunft der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Zusätze

Material	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
BCIP color development substrate	Promega, Madison (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
DMEM	Sigma-Aldrich, Steinheim

Material	Hersteller
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glutamin	Merck, Darmstadt
Heparin Natrium	Serva, Heidelberg
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Isotonische Salzlösung, CASY®ton	Roche, Reutlingen
Magnesiumchlorid, 25mM	Promega, Madison (USA)
Milchpulver (Blotting Grade Blocker)	Bio-Rad, München
Natrium-Azetat	Merck, Darmstadt
NBT color development substrate	Promega, Madison (USA)
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
PBS-Tabletten	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching (Österreich)
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Sequencing grade solution dNTP's	GE-Healthcare, Wien
TMB-Reagenz	Kementec Diagnostics, Kopenhagen (Dänemark)
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x)	PAA, Pasching (Österreich)
Tween®20 (Polyoxyethylene-sorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg

2.1.3 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden mit deionisiertem, über eine Milli-Q Filteranlage (Millipore) aufgereinigtem Wasser angesetzt.

Tab. 2.3 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Material	Zusammensetzung
Alkalische Phosphatase-Puffer	100mM Tris-Cl (pH 9,0), 150mM NaCl, 1mM MgCl ₂

Material	Zusammensetzung
Assay Puffer (human PIGF-2 ELISA)	0,05%(v/v) Tween®20, 1%(w/v) BSA in PBS
Assay Puffer (human sFlt-1 ELISA)	1%(w/v) BSA in PBS
Assay Puffer (mouse PIGF ELISA)	1%(w/v) BSA in PBS
Blockpuffer (human PIGF ELISA)	0,1 %(v/v) Tween®20, 2%(w/v) BSA in 2x PBS
Blockpuffer (human sFlt-1 ELISA)	3%(w/v) Milchpulver in PBS
DEPC-Wasser (RNase frei)	0,2%(v/v) DEPC in H ₂ O (2x autoklaviert)
Elektrophoresepuffer (1x)	25mM Tris, 197mM Glycin, 0,1%(w/v) SDS in H ₂ O
Gelatine Lösung	1%(w/v) Gelatine in PBS; 0,45 µM filtriert
Green Go Taq Flexi Buffer 5x	Promega, Madison (USA)
Milchpuffer	50%(w/v) Milchpulver in TBS
SDS-Sammelgel (7,5 %)	3 ml H ₂ O, 1,25ml Sammelgelpuffer, 0,75ml Acrylamid (30%(v/v)), 100µl APS (10%(w/v)), 10µl TEMED
SDS-Sammelgelpuffer	0,5M Tris-Cl, 0,4%(w/v) SDS, pH 6,8
SDS-Sample Buffer (4x)	4ml H ₂ O, 1ml 0,5M Tris-Cl (pH 6,8), 0,8ml Glycerol, 1,6ml SDS (10%), 0,2ml Bromphenolblau (0,05%), 5%(v/v) β-Mercaptoethanol
SDS-Trenngelpuffer	1,5M Tris-Cl, 0,4%(w/v) SDS, pH 8,8
TBE-Puffer (10x)	0,89M Tris-OH, 0,89M Borsäure, 0,02M EDTA
TBS (1x)	20mM Tris-Cl, 150mM NaCl, pH 8
TBST	0,05%(v/v) Tween®20 in TBS
Transferpuffer (1x)	48mM Tris-Cl, 20%(v/v) Methanol, 39mM Glycin, 0,037%(w/v) SDS, pH 8,2
Trenngel (15%)	2,3ml H ₂ O, 2,3ml Trenngelpuffer, 5,4ml Acrylamid (30%(v/v)), 100µl APS (10%(w/v)), 10µl TEMED
Waschpuffer (human PIGF, mouse PIGF ELISA)	0,05%(v/v) Tween®20 in PBS
Waschpuffer (human sFlt-1 ELISA)	50mM Tris-Cl, 0,2%(v/v) Tween®20; pH 8

2.1.4 Proteine und Enzyme

Tab. 2.4 Herkunft der eingesetzten Proteine und Enzyme

Material	Hersteller
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
rekombinantes human PlGF-2	ReliaTech, Wolfenbüttel
rekombinantes human sFlt-1	ReliaTech, Wolfenbüttel
rekombinantes mouse PlGF-2	R&D Systems, USA
sFlt-1(6)	ReliaTech, Wolfenbüttel
Streptavidin-Poly-Horseradish peroxidase	Pierce, IL, USA
Streptavidin-Poly-Horseradish peroxidase	R&D Systems, USA
Taq-Polymerase	Promega, Madison (USA)

2.1.5 Antikörper

Tab. 2.5 Übersicht über die Herkunft der verwendeten Antikörper

Material	Hersteller
anti-PlGF K1425	ReliaTech, Wolfenbüttel
anti PlGF K1425, biotinyliert	ReliaTech, Wolfenbüttel
anti-human PlGF (#178/G10)	ReliaTech, Wolfenbüttel
anti-human PlGF (#178/G10), biotinyliert	ReliaTech, Wolfenbüttel
anti-mouse IgG-HRP Konjugat	Promega, Madison (USA)
anti-rabbit IgG – AP Konjugat	Promega, Madison (USA)
anti-VEGFR-1 791, biotinyliert (Protein A gereinigt)	ReliaTech, Wolfenbüttel
goat anti-mouse PlGF-2, biotinyliert	R&D Systems, USA
mouse anti-VEGFR-1 Clon Flt 19 (Protein G gereinigt)	ReliaTech, Wolfenbüttel
rat anti-mouse PlGF-2	R&D Systems, USA

2.1.6 Zellkulturmaterial

Die für die Zellkultur verwendeten Medien wurden bei 121°C und 2 bar, für 20 Min 2 x autoklaviert oder über Filter (verschiedene Volumina, 0,22 und 0,45µm, Millipore Corporation, Billerica, USA) sterilfiltriert.

Zellkulturmaterialien wurden als sterile Einmalartikel von folgenden Firmen bezogen:

- Becton Dickinson, USA

- Greiner Bio-One, Frickenhausen
- Nunc, Wiesbaden
- Sarstedt, Nümbrecht

Tab. 2.6 Übersicht der Verwendeten Zellkultur-Medien

Medium	Zusammensetzung / Hersteller
MBE-Medium Heidelberger Art	15 %(v/v) FCS, 1%(w/v) Pen/Strep, 1%(w/v) Glutamin, 1%(v/v) n.e. Aminosäuren, 100µg/ml ECGF, 50µg/ml Heparin, 50µM β-Mercaptomethanol in DMEM
Endothelial Cell Media MV, PromoCell	Heidelberg Growth Medium enthält zusätzlich: 5%(v/v) FCS, 4 µl/ml ECGS, 90 µg/ml Heparin, 1µg/ml Hydrocortison, 1%(w/v) Pen/Strep

Tab. 2.7 Übersicht der eingesetzten Zellkulturen

Zellen	Zelltyp	Ursprungsorgan	Quelle
HUVEC, p4-9	Endothelzelle	humane Nabelschnur	Cambrex, USA
SNO-MEC, p23-40	Endothelzelle	Mauslunge	HZI
SNO-MEC Subclone C9	Endothelzelle	Mauslunge	HZI

2.1.7 Zellbiologisch wirksame Substanzen

Tab. 2.8 Herkunft der verwendeten zellbiologisch wirksamen Substanzen

Material	Hersteller
ECGF bovine	HZI, Braunschweig
FCS	Biowest, Nuaille (Frankreich)
FCS	PromoCell, Heidelberg
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim
TNF-α	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECGS	PromoCell, Heidelberg

2.1.8 Synthetische Oligonucleotide

Die für die PCR verwendeten Primer wurden u.a. bei der Firma Operon, Köln synthetisiert.

Tab. 2.9 Übersicht der eingesetzten Primer

Primer	Größe des PCR-Produkt [bp]	Sequenz 5'→ 3'	Quelle
h/m β -Actin (for)	780	5'-GACGAGGCCCGAGCAAGAG-3'	K. Greger
h/m β -Actin (rev)	780	5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3'	K. Greger
mPIGF (for)	200	5'-CACTTGCTTCTTACAGGTCC-3'	Feeney, 2003
mPIGF (rev)	200	5'-CACCTCATCAGGGTATTCAT-3'	Feeney, 2003

2.1.9 Kits

Tab. 2.10 Herkunft der verwendeten Kits

Material	Hersteller
First-Strand cDNA Synthesis Kit	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
mouse PIGF-2 DuoSet ELISA Development kit	R&D Systems, USA
ECL Western blotting detection reagents	Pierce, Rockford (USA)
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford (USA)

2.2 Primäre Zellkulturen

2.2.1 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

Die verwendeten Nabelschnurendothelzellen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) wurden ursprünglich aus den Venen der Nabelschnur isoliert und sind von der Firma Lonza (Schweiz) bezogen worden. Da diese Endothelzellen ein adhärentes Verhalten aufweisen, bilden sie während ihres Wachstums *in-vitro* Monolayer auf dem Boden von Kulturgefäßen aus. Zu Beginn der Forschungsarbeit sind diese Zellen in Passage drei aufgetaut und bis Passage fünf kultiviert worden. Um diese für spätere Experimente zur Verfügung zu haben wurden sie mit dieser Passage in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die erneute Kultivierung ist je ein CryoTube™, mit ca. 500 000 Zellen in einer T25-Zellkulturflasche (25 cm²) ausgesät worden, welche mindestens eine Stunde vor der Kultivierung mit 1%iger Gelatine-Lösung beschichtet wurde. In *Endothelial Cell Medium MV* konnten ideale Wachs-

tumsbedingungen hergestellt werden, so dass die Zellen bereits nach zwei Tagen konfluent waren. Alle Experimente sind in den Passagen fünf bis neun durchgeführt worden.

2.2.2 Susanne Norgall-Microvascular Endothelial Cells (SNO-MECs)

Die murinen SNO-MECs (*Susanne Norgall – Microvascular Endothelial Cells*) sind in derselben Arbeitsgruppe in einer vorangegangenen Arbeit von Susanne Norgall isoliert worden und stammen aus Blutgefäßen der Mauslunge. *In-vitro* bilden diese Endothelzellen in Zellkulturgefäßen, aufgrund ihrer Adhärenz, ebenfalls Monolayer. Aufgetaut wurden diese Zellen in Passage 23, wobei sie hierbei in Kulturflaschen mit einer 1%igen Gelatinebeschichtung ausgesät wurden. Die Experimente erfolgten bis Passage 40. Die Zellen zeigen ein sehr schnelles Wachstum, das hier verwendete Medium ist MBE-Medium „Heidelberger Art“. Für die Experimente standen zusätzlich Subklone dieser Endothelzellen zur Verfügung, welche in Passage 61 aufgetaut wurden.

2.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten sind an einer sterilen Sicherheitswerkbank von Heraeus (Herasafe H12, Hanau) durchgeführt worden. Als Kultivierungsgefäße dienten Zellkulturflaschen mit einer Kultivierungsfläche von 25 cm² (T-25) oder 6-Well-Multischalen. Diese Gefäße wurden mit 1% Gelatine in PBS beschichtet, um die Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. Kultiviert wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von $\geq 95\%$.

2.3.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Da alle verwendeten Zellen zur längeren Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, mussten sie für alle folgenden Arbeiten aufgetaut werden. Die Zellen wurden deshalb aus dem Stickstofftank geholt und bei -70°C zwischengelagert, um möglicherweise noch enthaltenen Stickstoff entweichen zu lassen. Anschließend wurde das CryoTubeTM in ein 37°C warmes Wasserbad überführt, bis die Zellen getaut waren. Die Zellen wurden nun in ein mit Medium vorgelegtes Zentrifugenröhrchen überführt und dieses ist mit 800 rpm bei RT für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in einer definierten Menge an Medium gelöst. Diese Suspension wurde in eine T-25 Zellkulturflasche (25 cm² Kulturfläche) gegeben und auf ein Endvolumen von 5 ml aufgefüllt. Inkubiert wurde im Brutschrank, wie oben beschrieben, bei 37°C, 5% CO₂ und bei einer relativen Luftfeuchte von $\geq 95\%$.

Das Einfrieren von Zellen setzt eine sterile Herstellung des Einfriermediums aus Vollmedium mit 20% FCS und 10 % DMSO voraus. Dabei wirkt DMSO (Dimethylsulfoxid) als Gefrierschutzmittel und verhindert Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen. Die für die Langzeitlagerung vorgesehe-

nen Zellen wurden von der Kulturoberfläche abgelöst, in Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend im gekühlten Einfriermedium resuspendiert und unmittelbar danach auf die Einfrier-Vials aufgeteilt, um dann zum schonenden Herunterkühlen in einem Behälter mit Isopropanol (Cryo Freezing Container) für mindestens 12h bei -70°C zwischengelagert zu werden. Am Folgetag konnten die Vials in den Stickstofftank zur Langzeitlagerung bei -196°C überführt werden.

2.3.2 Medienwechsel

Da nach einer gewissen Zeitspanne, je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen, bestimmte Medienzusätze mit der Zeit verbraucht waren oder bei einer Temperatur von 37°C langsam zerfallen, benötigen alle verwendeten Endothelzellkulturen zur Erhaltung ihrer Zellvitalität regelmäßig einen Wechsel des Mediums. Dieser Medienwechsel wurde bei schnellwachsenden Kulturen alle zwei bis drei Tage mit auf 37°C vorgewärmtem frischen Medium durchgeführt. Dafür wurde unter der Sterilwerkbank das alte Medium abgesaugt und frisches hinzugegeben. Eine Übersicht der verwendeten Medien ist in Tab. 2.6 aufgeführt.

2.3.3 Subkultivierung von Zellen

Adhärente Zellen wachsen in der Regel nicht mehr weiter, wenn die Kulturschale von den Zellen komplett eingenommen wurde. Haben die Zellen also eine konfluente einlagige Zellschicht (Monolayer) ausgebildet, mussten sie vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst und eine Subkultur mit geringer Zelldichte angelegt werden (Passagierung). Die dafür häufigste Methode ist die enzymatische Ablösung mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung. Dabei ist zu beachten, dass die Zellen mit dem aktiven Trypsin nicht zu lang in Kontakt treten, da Trypsin/EDTA die Zelloberflächenrezeptoren stark angreift. Nach dem Entfernen des Mediums und zweimaligen Waschen mit calcium- und magnesium-freien PBS konnte durch Zugabe von Trypsin/EDTA die enzymatische Ablösung erfolgen. Der Ablösevorgang wurde mit Vollmedium abgestoppt und die Zellen sind mit einer Dichte von mindestens 10 000 Zellen/cm² in einem neuen Kulturgefäß ausgesät worden.

2.3.4 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden zwei Methoden angewendet, die nachfolgend genauer vorgestellt werden:

- Elektronische Zählung: Casy 1 Cell Counter und Analyse System TT
- Optische Zählung: Neubauer-Zählkammer

2.3.4.1 Casy1 Cell Counter

Das elektronische Zellzählgerät arbeitet nach dem Widerstandsprinzip. Zur Messung der Zellzahl wurden 50 µl der Zellprobe in 10 ml einer isotonischen, partikelreinen Salzlösung (CASYton) mit definierter Leitfähigkeit gelöst. Ein Aliquot wurde anschließend mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt. Beim Durchtritt durch die Messkapillare verdrängten die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Dadurch kam es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke, welche als Impuls gemessen wurde. Die Anzahl der aufgezeichneten Impulse entsprach der Anzahl der Zellen in der Probe.

2.3.4.2 Neubauer-Zählkammer

Zur Überprüfung der Zellzahl wurde seltener als der Casy1 Cell Counter die Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Für diese Zählung sollte die Konzentration der Zellsuspension idealerweise 10^5 Zellen/ml betragen.

Die Zellsuspension wurde in die Zählkammer gefüllt. Diese besteht aus neun 1 mm^2 großen Quadraten. Bei einer Tiefe von 0,1 mm beträgt das Volumen der beinhaltenden Lösung 0,1 µl. Zur sicheren Bestimmung der Zellzahl wurden mindestens vier der großen Quadrate ausgezählt und davon der Mittelwert bestimmt. Die Berechnung der Zellzahl/ml ergibt sich aus dem ermittelten Mittelwert multipliziert mit dem Faktor 10^4 . Die Gesamtzellzahl berechnet sich aus dem Volumen der Zellsuspension mal der Zellzahl pro ml.

2.4 ***In-vitro* Stimulationsversuche**

Um herauszufinden, in welcher Form die Expression des Proteins PlGF der verwendeten Endothelzellen beeinflusst werden kann, wurden diese mit verschiedenen Stimulatoren und Wachstumsfaktoren behandelt. Für alle Stimulationen sind konfluent gewachsene Zellen in 24-well-Platten mit einer Dichte von $1-1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² subkultiviert worden. Die Inkubation erfolgte für 72 bzw. 96 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.4.1 **PMA-Stimulation**

Zur Stimulation mit PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) wurden die Endothelzellen mit Konzentrationen im Bereich von 0-50 ng/ml stimuliert. Dies geschah durch die Zugabe der gewünschten PMA-Konzentration zum Endothelzell-Vollmedium.

2.4.2 TNF- α -Stimulation

Die Stimulation mit TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) erfolgte nach demselben Prinzip wie die Stimulation mit PMA. Hierbei wurden jedoch Konzentrationen im Bereich von 0-20 ng/ml TNF- α eingesetzt.

2.4.3 FCS Stimulation

FCS (*fetal calf serum*) spielt für die Lebensfähigkeit der Endothelzellen *in-vitro* eine essenzielle Rolle. Daher ist davon auszugehen, dass in FCS enthaltene Substanzen für die Expression des Wachstumsfaktors PIGF ebenfalls eine regulierende Wirkung ausüben. Um im Medium die verschiedenen Konzentrationen an FCS zu erhalten, wurde vor Beginn der Stimulation ein Medium mit allen Supplementen bis auf FCS erstellt. Anschließend wurden die Zellen in Medium mit einem FCS-Gehalt im Bereich von 0-30% kultiviert.

2.4.4 ECGF/ECGS-Stimulation

Der *endothelial cell growth factor* (ECGF) bzw. das *endothelial cell growth supplement* (ECGS) sind ebenfalls essenzielle Bestandteile für das Wachstum der Endothelzellen in Kultur. ECGF wird hierbei im murinen und ECGS im humanen Medium zugesetzt. Es wurden ebenfalls Medien mit allen Supplementen bis auf ECGF/ECGS angefertigt, somit konnten die Zellen mit ECGF-Konzentrationen im Bereich von 0-200 μ g/ml und ECGS-Gehalten im Bereich von 0-8 μ l/ml kultiviert werden.

2.5 Nachweismethoden

2.5.1 Sandwich-ELISA

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) stellt ein Testsystem dar, mit dessen Hilfe Antigenmengen quantitativ bestimmt werden können. Dabei dient eine Enzym-Substratumsetzung als Indikatorreaktion. Mit Hilfe dieses Assays können Proteine und Viren sowie Hormone, Toxine und Pestizide in verschiedenen Proben z.B. in Blutseren, Milch oder Urin quantitativ nachgewiesen werden. Bei der praktischen Durchführung unterscheidet man zwischen dem direkten und dem indirekten ELISA. Beim direkten ELISA wird das Antigen durch einen Detektionsantikörper nachgewiesen. Im Gegensatz zur indirekten Methode, bei der ein erster Antikörper spezifisch an das Antigen bindet, wird ein zweiter Detektionsantikörper benötigt, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist.

Beim hier durchgeführten indirekten Sandwich-ELISA verwendet man zwei Antikörper die mit verschiedenen Epitopen spezifisch an das nachzuweisende Antigen gebunden werden. Zunächst wird der erste Antikörper (*coating* Antikörper) unspezifisch über hydrophobe Wechselwirkungen an einem festen Träger immobilisiert, z.B. einer 96-well-Platte. Die nachzuweisende Probe sowie der Standard

mit bekannten Konzentrationen werden anschließend in die Wells gegeben und inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe nachzuweisende Antigen. Überschüssiger Antikörper wird nach der Inkubationsphase durch sorgfältiges Waschen entfernt und ein zweiter biotinkoppelter Antikörper wird zugegeben. Dieser bindet wieder spezifisch an ein Epitop des Analyten. An den so entstandenen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex kann durch die selektive Bindung von Streptavidin an Biotin, welches mit der Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, gebunden werden.

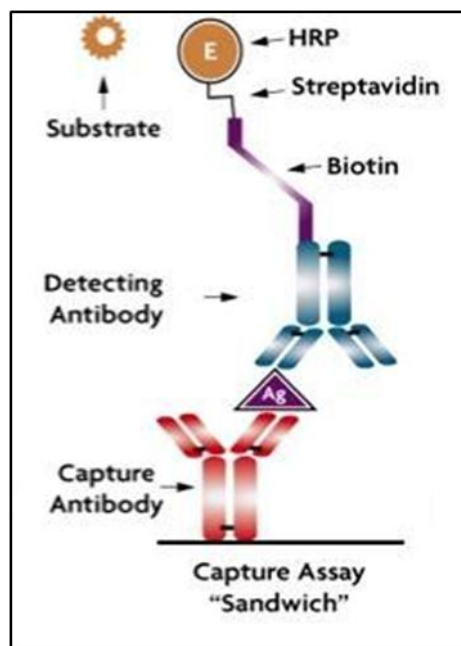


Abb. 2.1 Schematische Darstellung eines spezifischen Sandwich-ELISA. (modifiziert nach: http://www.activemotif.com/images/products/functionelisa_sandwich.jpg)

Dieses Enzym oxidiert nach Zugabe von TMB (Tetramethylbenzidin) zu einem Radikal (blau). Mit Hilfe von Schwefelsäure wird das Enzym inaktiviert und es erfolgt ein Farbumschlag nach gelb. Aus der Farbintensität der Probe ergibt sich die Konzentration des Antigens, wenn diese von einer erstellten Kalibrierfunktion aus den Standards abgelesen wird. Die Farbintensität ist umso intensiver, desto größer die Antigenkonzentration in der Probe ist (s. Abb. 2.1) (Glick und Pasternak, 1995).

Durchführung des human PIGF-Sandwich ELISA:

Der humane PIGF-Sandwich ELISA wurde zur Konzentrationsbestimmung von PIGF in Überständen humaner Zellen sowie in Lysaten von Plazentagewebe und HUVEC-Zelllysaten durchgeführt.

Zuerst wurde eine 96-well-Platte über Nacht bei 4°C mit 50 µl/well anti-human PIGF (#178/G10; c = 500 µg/ml, Endkonzentration 1 µg/ml, verdünnt in PBS) beschichtet. Ungebundene Antikörper wurden am folgenden Tag durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (0,05% Tween®20 in PBS) ent-

fernt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde mit 200 µl/well Blockpuffer (0,1% Tween®20, 2% BSA in 2x PBS) für 2,5 Stunden bei RT blockiert. Anschließend wurde die Platte wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Dann mit 100 µl/well Standard ($c = 1 \mu\text{g/ml}$, Standardreihe von 1 ng/ml bis 0,016 ng/ml, verdünnt in 0,05% Tween®20, 1% BSA in PBS; ReliaTech) und den Proben (verdünnt in 0,05% Tween®20, 1% BSA in PBS) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dem nächsten Waschvorgang wurde für eine Stunde bei RT mit dem biotinylierten Detektionsantikörper (0,5 µg/ml, verdünnt in 0,05% Tween®20, 1% BSA in PBS; ReliaTech) inkubiert. Nach Ablauf der Zeit folgte ein erneuter Waschvorgang und die Wells wurden mit 50 µl/well Streptavidin-Poly-HRP-Konjugat (1:50, 1:1000 Endverdünnung; Pierce, 1 mg/ml) für 20 Min inkubiert. Vor der Zugabe des Substrates erfolgten erneut drei Waschschrte. Die Oxidation des TMB-Farbreagens (Kementec Diagnostics) durch das Enzym wurde durch eine Blaufärbung sichtbar. Die Reaktion ist nach 5 bis 30 Min bei deutlicher Blaufärbung durch Zugabe von 50 µl/well 0,5M Schwefelsäure gestoppt worden. Nach erfolgreichem Farbumschlag wurde die Gelbfärbung mit einem Multiscan 8-Kanal-Photometer Ex405 bei einer Wellenlänge von 450/620nm gemessen.

Durchführung des mouse PlGF- Sandwich ELISA:

Der mouse PlGF-Sandwich ELISA wurde zur Konzentrationsbestimmung von PlGF in Überständen muriner Zellen durchgeführt.

Hierzu wurde das DuoSet ELISA Development Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet.

2.5.2 RNA-Isolation

Bei der Isolation von RNA aus Zellmaterial werden die Zellen in ein organisches Lösungsmittel aufgenommen, wodurch diese lysieren und eine Abtrennung der RNA von anderen Molekülklassen wie Proteinen oder Lipiden ermöglicht wird (Wink, 2004). Da bei der kompletten RNA-Isolation RNase frei gearbeitet wird, sollte mit DEPC-Wasser (2x autoklaviert) gearbeitet werden. Durch das vorangegangene Autoklavieren des DEPC-Wassers wird die Aktivität der RNasen zerstört (Mülhardt, 2006).

Durchführung:

Die RNA-Isolation erfolgte mittels eines Trizol-Protokolls nach der Anleitung des Herstellers GIBCO-BRL (saure Phenolmethode). Dabei wurden die Zellen einer konfluenten T25-Flasche nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml TRizol-Reagenz (Gibco BRL, Karlsruhe) auf die Zellen gegeben, die bei einer fünf minütigen Inkubationszeit bei RT lysierten. Danach wurde die Lösung homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 200 µl Chloroform gemischt, bis eine homogene, weißliche Emulsion entstand. Durch 15-minütiges Zentrifugieren (11000 rpm, 4°C, 15 Min) wurde die RNA von den Proteinen und der DNA getrennt. Proteine und DNA sammeln sich in der unteren, trüben, organischen

Phase, während sich die RNA in der unteren, klaren, wässrigen Phase befindet. Diese klare Phase wurde nach der Zentrifugation mit einer 100 µl Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben (insgesamt ca. 500 µl). Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde wieder gut gemischt, jedoch nicht auf dem Vortexer. Die RNA-Extraktion kann hier unterbrochen und die bisher gewonnene RNA-Chloroform-Isopropanol-Suspension (ca. 1000 µl) bei -20°C über mehrere Tage konserviert werden.

Nachdem die Suspension für 10 Min zentrifugiert wurde (11000 rpm, 4°C, 15 Min), wird die RNA als kleines Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar. Der Überstand wurde nun abgenommen und das Pellet mit 200 µl Ethanol (100%) durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer Pipette gewaschen und wieder abzentrifugiert (15 Min, 11000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet. Zuletzt wurde es in 100 µl DEPC-Wasser mit 10 µl 3M Natriumacetat und 250 µl Ethanol (100%) gelöst und über Nacht bei -20°C gelagert.

Um die Konzentration an isolierter RNA zu bestimmen, wurden 150 µl des Ansatzes entnommen und für 20 Min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das verbleibende Pellet getrocknet. Nach dem Trocknungsvorgang wurde es in 10 µl DEPC-Wasser durch 15 minütiges Erhitzen bei 60°C gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Dabei wurde die OD bei 260 und 280nm gemessen.

2.5.3 cDNA-Synthese

Für ein anschließendes PCR-Verfahren muss die RNA zuerst in die DNA umgeschrieben werden, da diese nicht direkt amplifiziert werden kann. Hierfür benötigt man eine Reverse Transkriptase (RTase), ein Enzym, das eine komplementäre DNA (cDNA) von der RNA erstellt. Die cDNA-Synthese funktioniert mit Hilfe des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA, an den ein Oligo(dT)-Primer komplementär angelagert wird. Dieser liefert dann die 3'OH-Gruppe für die RTase. Diese RTase synthetisiert anschließend, mit vier verschiedenen dNTPs, eine Kopie der mRNA. So entsteht ein cDNA – mRNA – Hybrid. Nachdem die mRNA durch alkalische Hydrolyse abgebaut wurde, erhält man anschließend die einzelsträngige cDNA (Nicholl, 1995).

Durchführung:

Die cDNA wurde mit Hilfe des First-Strand cDNA Synthesis Kits der Firma GE Healthcare synthetisiert. Als Probenmaterial dienten 5 µg RNA.

2.5.4 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine wichtige Methode der Molekularbiologie, mit der man eine bestimmte Zielsequenz schon mit wenigen Schritten stark amplifizieren kann (Nicholl, 1995). Sie diente in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis des PIGF-Gens in Endothelzellen.

Zur Vervielfältigung benötigt man außer der DNA noch zwei Primer. Zur Erzeugung dieser Primer müssen etwa 20 zusammenhängende Nucleotide beider Doppelstränge bekannt sein. Von diesen kurzen Oligonucleotiden gibt es jeweils einen forward und einen reverse Primer (s. Tab. 2.9). Sie dienen während der PCR als Startpunkte für die DNA-Synthese der Doppelstränge. Des Weiteren werden die vier Nucleotide, Puffer, der Templatestrang sowie ein synthetisierendes Enzym, die Polymerase, benötigt. Hierfür wird meist die Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* eingesetzt. Da das Bakterium in heißen Quellen lebt, weist das Enzym ein Aktivitätsmaximum bei 74°C auf. Ein PCR-Zyklus besteht grundsätzlich aus drei Schritten: Der Denaturierung, wobei durch kurzzeitiges Erhitzen der Lösung auf ca. 95°C die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt werden. Der nächste Schritt ist die Hybridisierung mit den Primern. Hier wird durch Abkühlen auf die Primer-spezifische Annealingtemperatur eine Hybridisierung der Primer mit jeweils einem dazu komplementären Einzelstrang der DNA ermöglicht. Da die Primer im großen Überschuss zugegeben werden, erfolgt praktisch keine Rückbildung des Doppelstranges aus den beiden Einzelsträngen. Der dritte Schritt ist die Extension. Nach Erhitzen der Lösung auf die optimale Reaktionstemperatur der Taq-Polymerase kommt es durch die Polymerase zur Verlängerung der beiden Primer in 5' → 3' Richtung. Die Folge ist die Replikation der beiden Stränge. Der Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung der Primer und Extension kann je nach Stabilität der Reagenzien und Art des PCR-Gerätes bis zu zwischen 30- und 40-fach wiederholt werden, so dass vom Amplifikat viele hundert Millionen Kopien vorliegen.

Zur Dokumentation der Transkripte werden die Probenansätze und Standards elektrophoretisch in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Durch eine Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid wurde diese im Gel unter UV-Licht sichtbar. Die Menge des interkalierenden Farbstoffes ist hierbei proportional zur DNA-Menge in der Probe.

Durchführung:

Für diese Arbeit wurden PCR-Ansätze für das PIGF-Gen durchgeführt. Es wurde bei jedem Versuch eine PCR mit β -Actin-Primern als Positivkontrolle für das Vorhandensein von mRNA durchgeführt, da dieses Gen in jeder Zelle aktiv ist. Zu Beginn der PCR wurde ein Reaktionsmix aus cDNA, Magnesiumchlorid, 5x Puffer (Green Go Taq Flexi Buffer 5x), dNTPs, Taq-Polymerase, for/rev Primern und Wasser erstellt (s. Tab. 2.11) und homogenisiert. Die verwendeten Primer sind in Tab. 2.13 dargestellt.

Nach Erstellung der PCR-Ansätze wurden diese in den PCR-Block gestellt und die PCR im Thermocycler nach spezifischer Programmeingabe gestartet (s. Tab. 2.12).

Tab. 2.11 PCR-Reaktionsansatz.

Agenzien	Konzentration	Eingesetzte Menge [μ l]
dNTPs	2,5 mM	1,6
MgCl ₂	25 mM	1,2
PCR-Puffer	5x	4,0
Primer (for)	10 μ M	2,5
Primer (rev)	10 μ M	2,5
Taq-Polymerase	-	0,25
cDNA (1:100)	-	2,0
DEPC-H ₂ O	-	5,95
Gesamtmenge	-	20

Zum Nachweis der Transkripte folgte eine Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurde ein 1%iges Agarosegel in die Gelkammer gegossen. Nach Abkühlen des Geles wurde die Kammer mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt. Als Größenmarker diente ein 100bp DNA Ladder von dem 6 μ l auf das Gel aufgetragen wurden. Die amplifizierten DNA-Sequenzen der einzelnen Proben wurden zu je 10 μ l in die Gel-taschen pipettiert. Im Anschluss daran wurde die Kammer verschlossen und die Elektrophorese mit 90 V für eine Stunde gestartet. Danach konnten die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Tab. 2.12 Übersicht der eingesetzten PCR-Programme.

Gen	PCR-Programm (´=min, ``=sek)
β -Actin	1x(95°C, 5`) 29x(94°C, 60``/55°C, 60``/72°C, 90``) 1x(72°C, 5`) 1x(15°C, 24h)
mPIGF	1x(95°C, 5`) 28x(94°C, 45``/57°C, 60``/72°C, 90``) 1x(72°C, 5`) 1x(15°C, 24h)

Tab. 2.13 Primer für die PCR. (rev = reverse, for = forward Primer). Die Primer wurden über die Firma Operon (Köln) bezogen)

Primer	PCR Produkt [bp]	Sequenz 5'→ 3'
h/m β -Actin (for)	780	5'-GACGAGGCCCGAGCAAGAG-3'
h/m β -Actin (rev)	780	5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3'
mPIGF (for)	200	5'-CACTTGCTTCTTACAGGTCC-3'
mPIGF (rev)	200	5'-CACCTCATCAGGGTATTCAT-3'

2.5.5 Lysatherstellung und BCA-Proteinbestimmung

2.5.5.1 Herstellung von Gewebelysat

Für die Herstellung von Lysaten aus Plazentagewebe wurde gefrorenes Gewebe in 1 ml RIPA-Puffer mit RNase-Inhibitor homogenisiert. Hierzu wurde das Gewebe und der Puffer mit Hilfe eines Dispergiergerätes (Ultra Turrax T) zerkleinert. Anschließend wurden die Proben für 5 Min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Proben bei -70°C gelagert.

2.5.5.2 Herstellung von Zell-Lysat

Bei der Herstellung von Endothelzell-Lysat wurden Zellen einer konfluent gewachsenen T-75 Zellkulturflasche lysiert. Dafür wurde das Medium der Zellen abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend 1 ml RIPA-Buffer auf die Zellen gegeben. Nachdem sich diese vom Boden abgelöst hatten, wurden sie in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -70°C eingefroren.

2.5.5.3 BCA-Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Lysate erfolgte mittels des BCATM Protein Assay Kits. Hierfür wurden 1-3 µl Zell-/Gewebe-Lysat eingesetzt.

2.5.6 Western Blot

2.5.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS)

Bei der SDS-Gelelektrophorese kommt es durch Reptation der Probemoleküle entlang der porösen Polyacrylamidmatrix zur Auftrennung der Proteine. Das Tensid SDS kann hierbei an den Proteinen angelagert werden, wodurch es zur Entstehung eines SDS-Protein-Komplexes kommt. Die Proteine haben dadurch eine negative Ladung, vergleichbar hydrodynamische Eigenschaften und unterscheiden sich lediglich in ihrer Größe. Der SDS-Protein-Komplex wandert anschließend im elektrischen Feld zum Plus-Pol (Rehm und Letzel, 2010). Für die SDS gibt es grundsätzlich zwei Varianten, die reduzierende und die nicht-reduzierende Methode. Bei der reduzierenden Methode wird dem Probenpuffer 2-Mercaptoethanol als reduzierendes Agens zugesetzt. Durch 2-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken reduziert und Quartär- sowie Tertiärstrukturen zerstört, wodurch komplexe Proteine in ihre Untereinheiten zerfallen.

Durchführung:

Zu Beginn wurde die Trenngellösung angemischt und zwischen die Glasplatten, bis ca. 2 cm vor deren Oberkante, in der aufgebauten Gießstation gegossen. Auf das Gel ist eine Schicht aus Ethanol gegossen worden, um einen geraden Abschluss des Gels zu ermöglichen. Nach 20 Min Polymerisation wurde der Ethanol abgegossen und das neu pipettierte Sammelgel darauf gegeben. Nach dem Einsetzen des Kammes wurde das Gel wieder für 15 Min auspolymerisiert.

Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt und 1x Elektrophoresepuffer zugegeben. Die Proben wurden anschließend in 4x SDS-Probenpuffer mit 5% β -Mercaptoethanol verdünnt und bei 95°C für 5 Min reduziert. Pro Geltasche wurden bis zu 50 μ g Protein aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben sind 6 μ l Protein-Standard in das Gel geladen worden. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 100 V für 15 Min, bis die Proben aus den Geltaschen und vor das Sammelgel gelaufen waren. Anschließend wurde die Spannung auf 200 V erhöht und nach ca. 45 Min die Elektrophorese beendet. Das Gel wurde aus der Apparatur entnommen und 15 Min in Transferpuffer gelagert.

2.5.6.2 Semi-Dry-Blotting-Verfahren

Im Semi-Dry-Blotting-Verfahren werden Proteinmuster eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine adsorbierende Membran übertragen. Beim Blotten wird das Acrylamidgel luftblasenfrei auf eine spezielle proteinbindende Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) gelegt, umrahmt von jeweils zwei Lagen Filterpapier. Vor dem Blott sollte das Gel 10-15 Min in Transferpuffer inkubieren um die SDS-Konzentration im Gel zu senken, da dieses den Transfer kleinerer Polypeptide beeinträchtigen kann. Im Gegensatz dazu kann die Zugabe von Methanol im Transferpuffer die Bindung der Proteine an die Membran erheblich stärken.

Durchführung:

Der Western-Blot ist mit der *Semi-dry*-Blotting Apparatur von BIORAD durchgeführt worden. Die eingesetzte Membran bestand aus Polyvinylidenfluorid (PVDF), welche vor dem Blot mit Methanol benetzt und kurz mit deionisiertem Wasser abgespült wurde. Das Blotting-Sandwich, zusammengesetzt aus 4 Lagen Blottingpapier (Whatman® Paper), PVDF-Membran, Gel und nochmals 4 Lagen Blottingpapier, wurde nach gutem Befeuchten mit Transferpuffer in die Blotting-Apparatur eingesetzt. Nach dem Verschließen der Kammer erfolgte das Blotten bei 15 V für 25 Min.

2.5.6.3 Immunoblot

Der Immunoblot ist eine immunologische Methode, welche zur Sichtbarmachung spezieller Proteine auf einer Membran dient. Der Nachweis wird hierbei durch spezifisch bindende Antikörper ermöglicht (Rehm und Letzel, 2010).

Vor der eigentlichen Proteindetektion müssen alle freien Stellen auf der Membran abgesättigt werden, damit die Antikörper spezifisch binden können und nicht unspezifisch an diesen freien Stellen auf der Membran haften. Der erste, primäre Antikörper ist nicht enzymmarkiert. Der zweite Antikörper, welcher selektiv den primären Antikörper erkennt, ist mit einem Enzym konjugiert. Dies ist entweder die alkalische Phosphatase (AP) oder die Meerrettich-Peroxidase (HRP). AP-konjugierte Antikörper können dann mit farbgebenden Substraten direkt angefärbt werden, während HRP-konjugierte Antikörper die Oxidation von Luminol katalysieren und somit eine Chemolumineszenz

auslösen. Diese ECL-Reaktion ist etwa 10mal sensitiver als die Blotentwicklung mit AP. Die Visualisierung erreicht man durch Auflegen eines Röntgenfilms für einige Sekunden bis Minuten, wonach die Proteinbanden durch Schwarzfärbung auf dem Film sichtbar werden (s. Abb. 2.2).

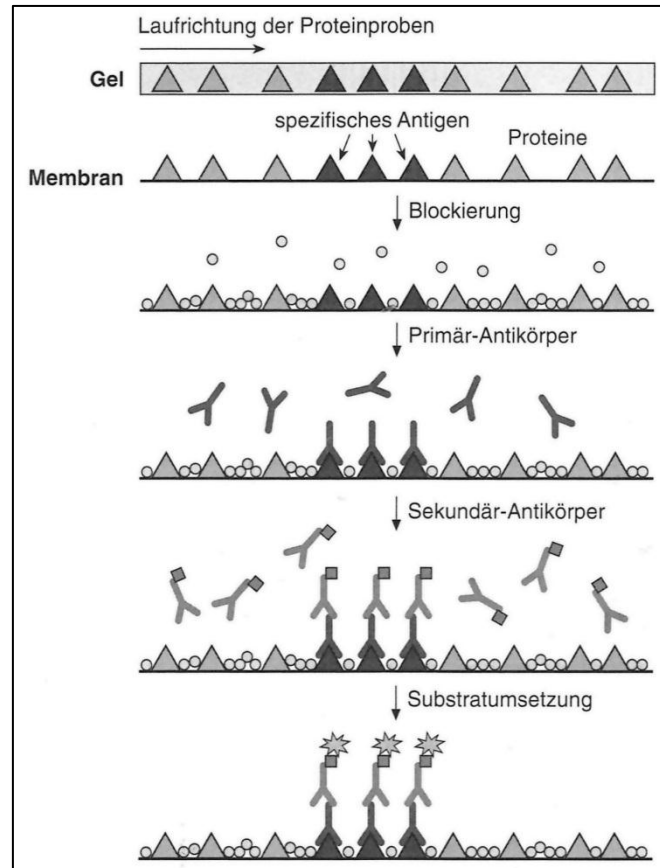


Abb. 2.2 Detektion von Proteinen auf Membranen. (modifiziert nach: Raem und Rauch, 2007)

Durchführung:

Unmittelbar nach dem Blot wurde die Membran zunächst für 30 Min bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockpuffer (Blotting grad Blocker) gegeben, um die nicht besetzten Stellen auf der Membran zu blockieren. Danach ist der erste Antikörper (anti-human PIGF (#178/G10): 1:2000; anti-PIGF K1425: 1:500, ReliaTech), verdünnt in 10% Milch (0,1% Fett) + TBS, nach einem dreifachen Waschvorgang für jeweils 5 Min in TBST, auf die Membran gegeben und für 60 Min bei RT auf dem Schüttler inkubiert worden. Es folgte ein erneuter Waschvorgang zur Entfernung ungebundener Antikörper. Der zweite Antikörper (anti-mouse IgG-HRP Konjugat: 1:10000, Promega; anti-rabbit IgG – AP Konjugat: 1:2000, Promega), verdünnt in 10% Milch (0,1% Fett) + TBST, wurde zugegeben und für 60 Min mit der Membran inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden mit TBST abgewaschen. Danach folgte der AP- bzw. ECL-Nachweis.

Für den AP-Nachweis wurden 66 µl NBT und 33 µl BCIP in 10 ml AP-Puffer gelöst und auf die Membran gegeben. Nach 10-20 Min war eine deutliche Anfärbung der Proteine zu erkennen.

Für den ECL-Nachweis wurden die ECL Western-Blot Reagenzien (ECL Western blotting detection reagents) 40:1 vermischt und ca. 2 ml dieser Lösung auf der Membran verteilt. Nach 2 Min wurde diese Lösung abgekippt und die Membran in Folien eingepackt. Die am zweiten Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase oxidierte das Luminol des ECL, wodurch ein Lichtsignal abgegeben wurde. Dieses konnte mittels Röntgenfilmauflage (Amersham Hyperfilm ECL) registriert und im Anschluss daran dokumentiert werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Nachweis des PIGF Proteins in Lysaten humaner Plazenta

Aus vorangegangenen Experimenten ist bekannt, dass PIGF in hohen Mengen in den Trophoblasten der Plazenta exprimiert wird (Hauser und Weich, 1993).

Um die Menge von PIGF, die in der menschlichen Plazenta exprimiert wird, quantitativ zu erfassen, sind Lysate aus Plazentagewebe angefertigt worden. Aus diesen wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Im Anschluss daran wurde eine Analyse dieser Lysate mittels Western Blot und human PIGF-Sandwich-ELISA durchgeführt. Im ELISA konnte die genaue Konzentration von dem vorkommenden Wachstumsfaktor quantitativ bestimmt werden.

3.1.1 Nachweis über die Western Blot – Methode

In seiner natürlichen Form kommt PIGF-1 und PIGF-2 als Dimer mit einer Molekülmasse von 50 – 55 kDa vor. Bei Aufspaltung der Disulfidbrücken, durch Reduktion mit anschließendem Zerfall in seine Untereinheiten, entstehen Monomere mit einem Molekulargewicht von 20 – 25 kDa.

Mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine der Lysatproben aufgetrennt und mit Hilfe eines *Semi-dry* Blot auf eine Membran transferiert. Der Wachstumsfaktor PIGF wurde im Anschluss mit Antikörpern detektiert. Hierzu wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, welcher an PIGF-1 und PIGF-2 bindet, genutzt. Der zweite anti-mouse IgG Antikörper war HRP konjugiert und es wurde anschließend der ECL-Nachweis durchgeführt. In Abb. 3.1 ist der Röntgenfilm des Western Blottes abgebildet. Es hatten sich Banden im Bereich von 25 kDa, 55 kDa und 95 kDa gezeigt.

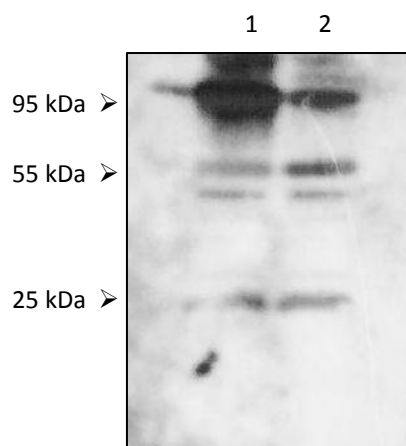


Abb. 3.1 Western Blot mit Lysaten aus humaner Plazenta. (1) Plazentaprobe A (reduziert) (2) Plazentaprobe B (reduziert).

Bei einer entsprechenden Molekülmasse von 25 kDa erkannte man die Banden der Monomere des PIGF-Proteins. Da PIGF-2 im Gegensatz zu PIGF-1 an seinem Carboxylende eine 21-Aminosäure-lange Heparinbindedomäne aufweist (De Falco et al., 2002), entstanden jeweils zwei Banden im Bereich von 25 kDa und 55 kDa, wobei die Banden im Bereich von 55 kDa die nicht reduzierten Dimere zeigten. Die etwas schwereren Proteine stellten jeweils die PIGF-2 Formen dar. Banden, die bei einem Molekulargewicht von 95 kDa zu sehen waren, standen in keinem Zusammenhang zu dem PIGF-Protein, da es sich hier um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an ein Protein handelte.

3.1.2 Quantifizierung mit Hilfe des PIGF Sandwich-ELISA

Nachdem das Vorkommen des Proteins im Western Blot nachgewiesen werden konnte, sollte die genaue Konzentration an PIGF ermittelt werden. Diese wurde mittels PIGF-Sandwich-ELISA, der die Gesamt-PIGF-Konzentration in humanen Proben erfassen konnte, quantifiziert. Die Gesamt-PIGF-Konzentration umfasst hierbei den Gehalt an freiem und komplexiertem PIGF in den Lysaten.

Die Abb. 3.2 zeigt die ermittelten PIGF Konzentrationen in den beiden Plazenta-Proben. Um einen vergleichbaren Wert zu erhalten, musste vor dieser Messung eine Proteinkonzentrationsbestimmung gemacht werden. Die erhaltene PIGF-Konzentration konnte so in ein Verhältnis zur Proteinmenge in der Probe gesetzt werden.

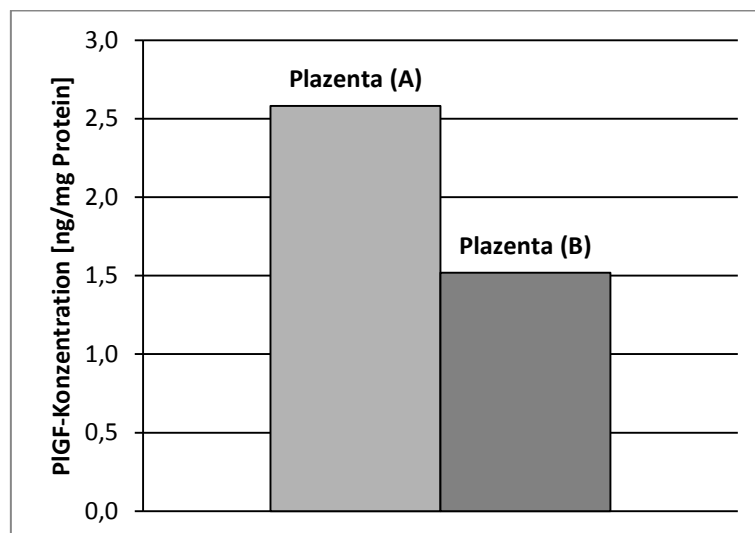


Abb. 3.2 PIGF-Konzentrationen in humanen Plazenta-Lysaten. Aus einem Plazenta-Gewebe wurden zwei Lysate (Doppelbestimmung) erstellt und die PIGF-Konzentration mittels ELISA quantifiziert.

Die Konzentration der Probe A beträgt 2,58 ng/mg Protein und enthält im Vergleich zu Probe B somit das 1,7-fache von dem Wachstumsfaktor.

3.2 Untersuchung der PlGF Expression in Lysaten humaner Endothelzellen

Es ist bekannt, dass PlGF von Endothelzellen relativ stark exprimiert wird (Hauser und Weich, 1993). In der Plazenta wird PlGF ausschließlich von den Trophoblasten synthetisiert, welche aus zwei Schichten bestehen: einer Lage proliferierender Stammzellen mit direktem Kontakt zum Zytotrophoblasten und den Synziotrophoblasten, welche durch Fusion der Zytotrophoblasten entstehen (Huppertz und Herrler, 2005). Da PlGF von diesen Schichten wiederum nur von Synziotrophoblasten sezerniert wird und diese durch ihre fusionierende Eigenschaft schwer in Kultur zu halten sind, wurden alle weiteren Experimente mit Endothelzellen durchgeführt. Diese sind leichter zu kultivieren und für Untersuchungen der Genexpression ausreichend.

Durch Quantifizierung des PlGF-Gehalts im Zell-Lysat von HUVECs konnte ein Vergleich zur PlGF-Konzentration in der Plazenta hergestellt werden. Die Quantifizierung wurde mittels human PlGF-Sandwich ELISA durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 dargestellt. Hier beträgt die PlGF-Konzentration im HUVEC-Lysat 2,51 ng/mg Protein. Vergleicht man diesen Wert mit der ermittelten PlGF-Konzentration in der Plazenta, so sind diese Konzentrationen annähernd gleich hoch. Da in der Plazenta ausschließlich Synziotrophoblasten PlGF sezernieren, befand sich im Zell-Lysat eine größere Anzahl an Zellen, welche zur PlGF-Expression in der Lage waren. Schlussfolgernd war festzustellen, dass Synziotrophoblasten größere Mengen an PlGF sezernieren als Endothelzellen, da sie nur einen kleinen Prozentsatz der Zellen in der Plazenta ausmachen.

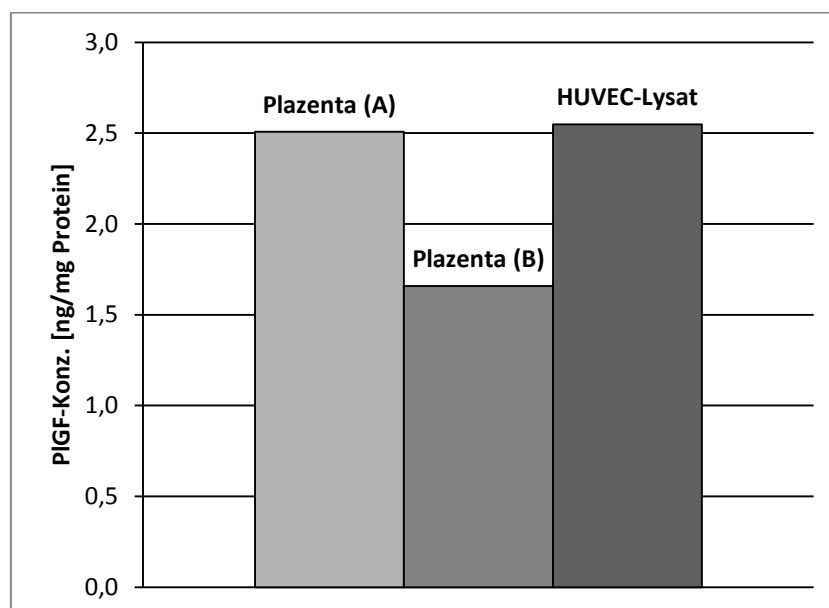


Abb. 3.3 Vergleich der PlGF-Konzentrationen zwischen Plazenta- und HUVEC-Lysat. Das HUVEC-Lysat wurde aus HUVEC, p9 erstellt.

3.3 Quantifizierung der PlGF-Expression in Zellüberständen von humanen und murinen Endothelzellen

Endothelzellen sezernieren Wachstumsfaktoren direkt in das umgebende Medium. Somit war es möglich, durch Messung der PlGF-Konzentration in den Überständen der Zellen, die Menge an freigesetztem PlGF genau zu quantifizieren. Um die natürliche PlGF-Expression der in Folgeversuchen stimulierten Endothelzellen genau zu dokumentieren, wurden Zeitkinetiken erstellt. Zu diesem Zweck wurde in genau definierten Zeitabständen die PlGF-Konzentration im ELISA ermittelt.

3.3.1 PlGF-Expression in Zellüberständen von *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs)

HUVECs (15×10^3 Zellen/cm²) sind in 24 Well Platten, mit je 1 ml Medium/well kultiviert worden. Die Überstände wurden alle 24 Stunden entnommen und im human PlGF-Sandwich ELISA gemessen. Die Konzentration stieg von 0,16 ng/ml am ersten Tag bis zu einer Konzentration von 4,4 ng/ml am sechsten Tag (s. Abb. 3.4). Ab dem dritten Tag stieg die PlGF-Konzentration auf Werte über 0,5 ng/ml. Da Werte in diesem Bereich im ELISA optimal zu messen sind, wurden die Überstände für Stimulationen mit den humanen Zellen immer am dritten Tag nach der Kultivierung mit dem Stimulationsfaktor entnommen.

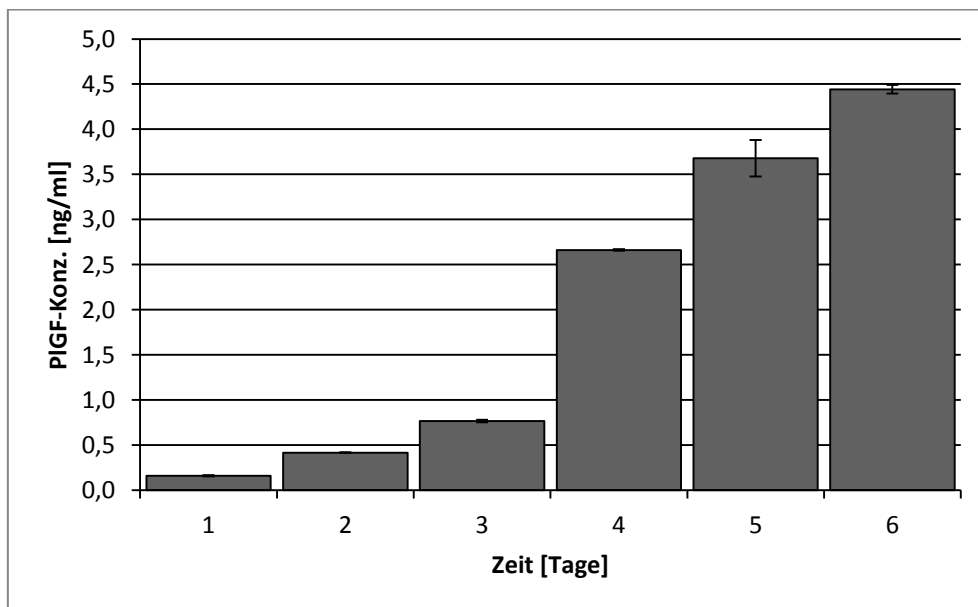


Abb. 3.4 PlGF-Zeitkinetik in HUVEC, p7. Konzentrationsbestimmung von Überständen zwischen dem 1. und 6. Tag. Die Balken zeigen die absolute Standardabweichung (σ).

3.3.2 PIGF-Expression in Zellüberständen von End C57BI/6, SNO-MECs und SNO-MEC Subclonen

In vergangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass HUVECs hohe Konzentrationen an PIGF exprimieren (Hauser und Weich, 1993). Dies konnte zu Beginn der Arbeit bestätigt werden. Mit murinen Endothelzellen sind hingegen bisher kaum Studien zur PIGF-Expression durchgeführt worden. In der Arbeit von Georg Richter (Richter, 2008) konnte jedoch auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass Endothelioma-Zellen und SNO-MECs das Gen für PIGF aufweisen.

Infolgedessen wurden Endothelioma C57BI/6 und SNO-MECs kultiviert. Es stellte sich heraus, dass die Endothelioma-Zellen kein PIGF sezernierten. Die SNO-MECs hingegen, zeigten eine Expression des PIGF-Gens (s. Abb. 3.5).

Da der Gehalt an PIGF im Überstand vom zweiten zum achten Tag nur sehr gering anstieg, sollte ein SNO-MEC Subklon detektiert werden, welcher eine höhere Konzentrationen an PIGF freisetzt.

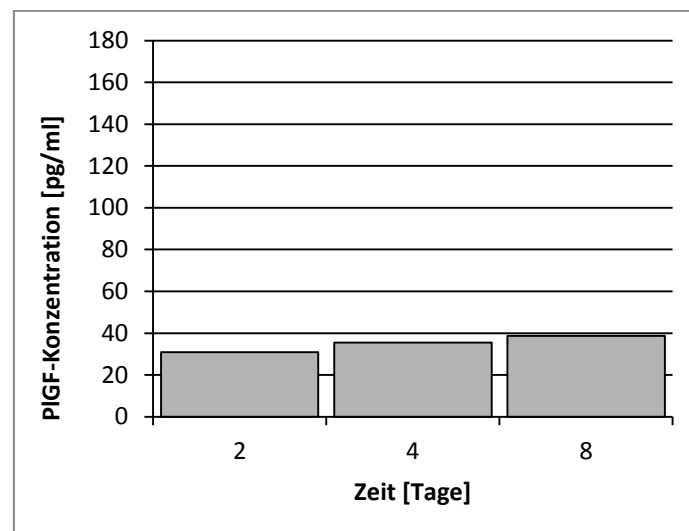


Abb. 3.5 PIGF Zeitkinetik in SNO-MECs, p24. Konzentrationsbestimmung von Überständen am 2., 4. und 8. Tag.

Zu diesem Zweck wurden sechs Subklone, welche in einer früheren Arbeit isoliert wurden, in Kultur genommen und auf Vorhandensein des Gens bzw. deren PIGF-Gehalt untersucht. Die Subklone wurden auf mRNA-Ebene mittels PCR analysiert und der PIGF-Gehalt im Medium anschließend mittels mouse-PIGF-ELISA quantifiziert. Das PCR-Ergebnis ist in Abb. 3.6 dargestellt. In Abb. 3.6B zeigten alle Subklone eine Bande im Bereich von 200 bp, was belegt, dass alle das PIGF Gen in einer Exon-Region involviert hatten. Der SNO-MEC Subklon C9 lässt zudem eine stärkere Bande erkennen, welche auf eine höhere Konzentration an mRNA und demzufolge eine stärkere Expression des Proteins zurückzuführen war.

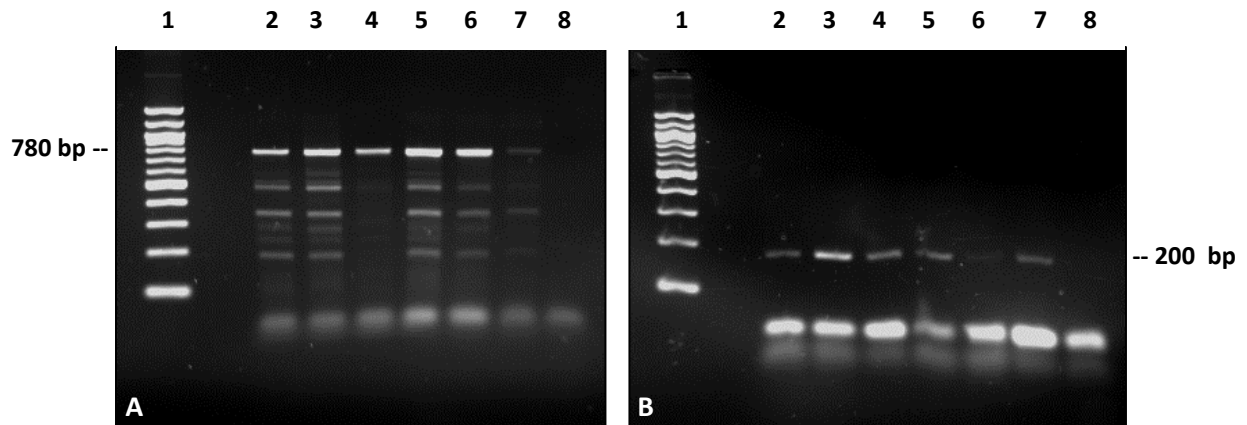


Abb. 3.6 Untersuchung der PlGF-Genaktivität mittels PCR. (A) β -Actin PCR (Postivkontrolle) (B) mPlGF-PCR (1) 100 bp-Marker (2) Subklon C10 (3) Subklon C9 (4) Subklon A7 (5) Subklin D7 (6) Subklon B10 (7) Subklon B10 (8) neg. Kontrolle

Im ELISA konnte dieses Ergebnis erneut bestätigt werden (s. Abb. 3.7). Der SNO-MEC Subklon C9 lag mit einer Konzentration von 165 pg/ml nach zwei Tagen ein Fünffaches über der Konzentration der normalen SNO-MECs (30,9 pg/ml, Abb. 3.5). Ebenso lag die Konzentration über allen anderen Subklonen.

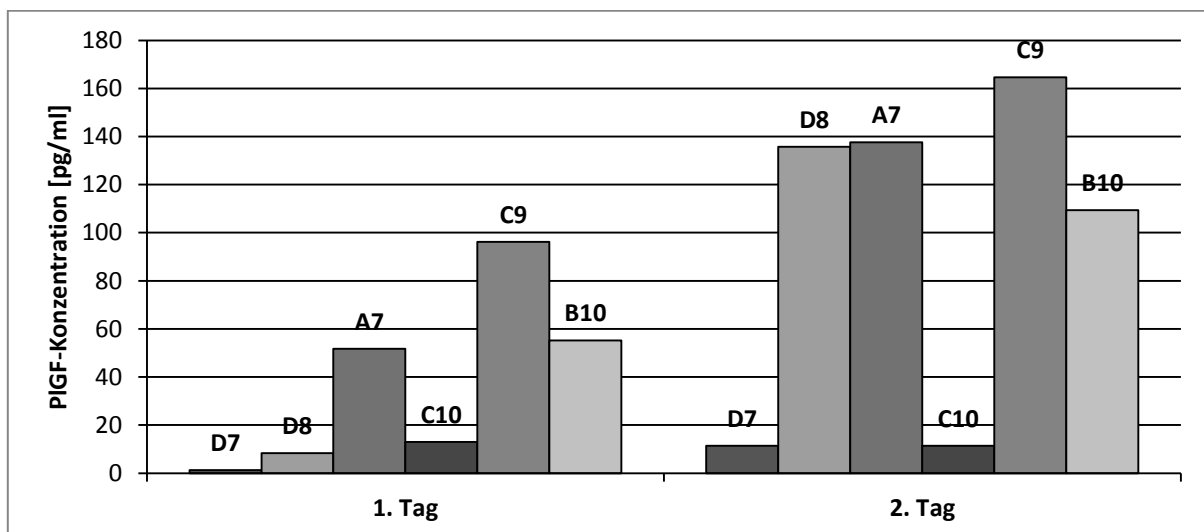


Abb. 3.7 PlGF-Konzentrationsbestimmung in verschiedenen SNO-MEC Subklonen. Bestimmung von Überständen nach je 24 und 48 Stunden.

3.4 Stimulation der PlGF-Expression humaner und muriner Endothelzellen *in vitro*

Um nähere Einblicke in die Physiologie des Wachstumsfaktors PlGF zu erlangen, wurde die Regulation der Genexpression durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren untersucht. Dafür wurden die Zellen mit genannten Faktoren stimuliert und anschließend die PlGF-Konzentration im ELISA

quantifiziert. Diese Fragestellung war 1994 Thema in einer Dissertation von Bernhard Barleon (Barleon, 1994), in der sie mit Hilfe des Northern-Blots analysiert worden ist. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser und der vorangegangenen Arbeit wird in der anschließenden Diskussion näher erläutert.

3.4.1 Konzentrations- und zeitabhängige Stimulation mit PMA

PMA ist ein Phorboldiester zur Aktivierung der Proteinkinase C. Da es die Angiogenese stimuliert (Nishizuka, 1984), sollte nun untersucht werden, ob sich dies auch auf die Expression von PlGF auswirkt.

Die HUVECs wurden mit je 20 ng/ml PMA im Medium stimuliert und der Anstieg der Konzentration an PlGF im Überstand wurde alle 24h gemessen. Das folgende Balkendiagramm (s. Abb. 3.8) zeigt die Ergebnisse dieser zeitabhängigen Stimulation. Die normale PlGF-Konzentration der HUVECs stieg mit fortlaufender Zeit bis auf einen Wert von 4,4 ng/ml an, wobei die mit PMA stimulierten Zellen mit einer PlGF-Konzentration von ca. 0,5 ng/ml keinen Anstieg zeigten.

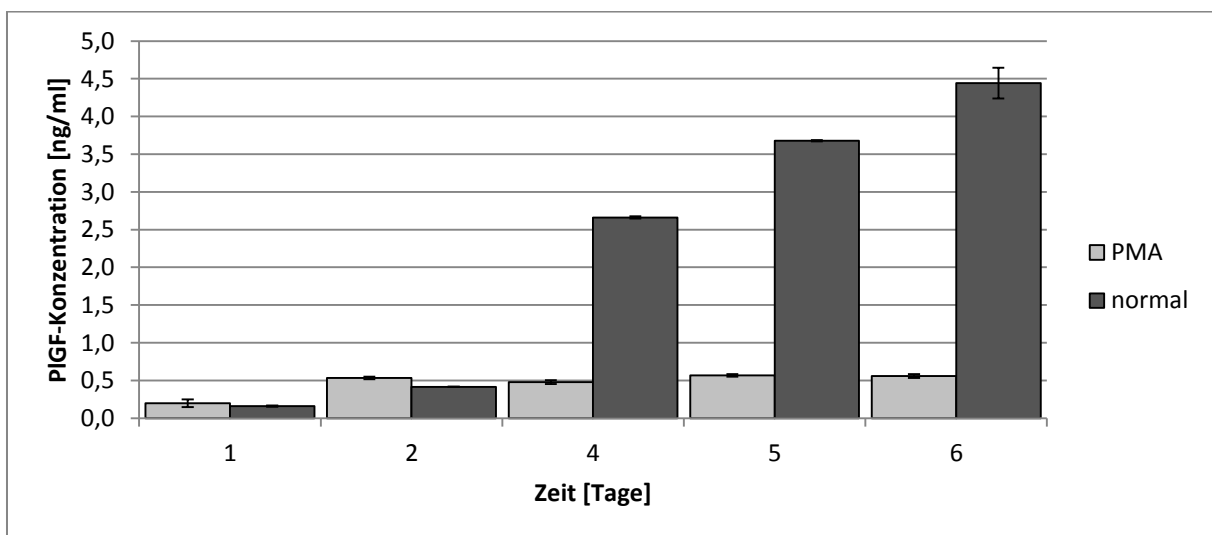


Abb. 3.8 PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur Zeit unter Einfluss von PMA. HUVECs, p6 wurden stimuliert mit 20 ng/ml PMA und aller 24h Überstand entnommen. Die senkrechten Balken zeigen die absolute Standardabweichung (σ).

Nach diesem Ergebnis sollte nachgewiesen werden, ob außerdem eine Dosis-Abhängigkeit von PMA vorliegt. Dies wurde mit humanen (HUVEC, s. Abb. 3.9) und mit murinen (SNO-MEC Subklon C9, s. Abb. 3.10) Endothelzellen getestet. Bei Stimulation der humanen Zellen war mit 5 ng/ml PMA im Medium ein leichter Anstieg der PlGF-Konzentration zu erkennen. Ab einem PMA-Gehalt von 20 ng/ml war keine deutliche Änderung mehr zu vernehmen.

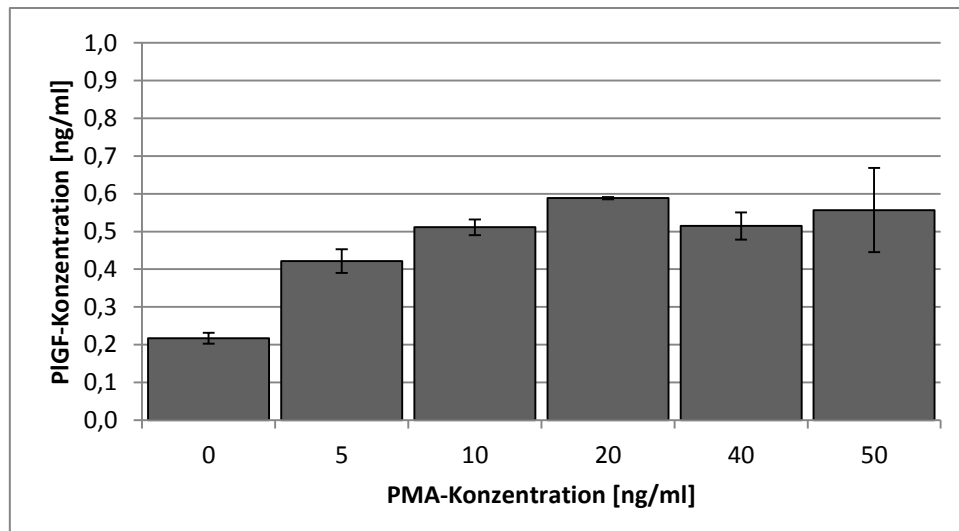


Abb. 3.9 PIGF-Konzentration in Abhängigkeit zur PMA-Konzentration. HUVEC, p8 wurden stimuliert mit unterschiedlichen Konzentrationen an PMA und es wurde am 3. Tag der Überstand entnommen. Die Balken zeigen die absolute Standardabweichung (σ).

Die Stimulation der murinen Endothelzellen zeigte keine bedeutende Veränderung der PIGF-Konzentration. Die SNO-MECs sezernierten demnach, bei jedem PMA-Gehalt im Medium, ca. 20 pg/ml PIGF.

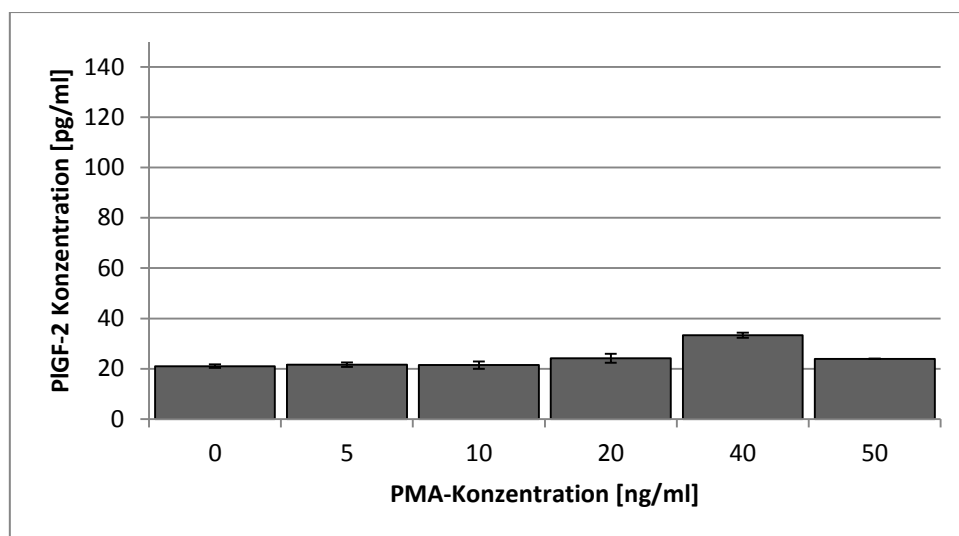


Abb. 3.10 PIGF-Konzentration in Abhängigkeit zur PMA-Konzentration. SNO-MEC C9 Subklone, p79 wurden stimuliert mit unterschiedlichen Konzentrationen an PMA und es wurde am 4. Tag der Überstand entnommen. Die Balken zeigen die absolute Standardabweichung (σ).

3.4.2 Konzentrationsabhängige Stimulation mit TNF- α

Ähnlich wie bei PMA wurden verschiedene Konzentrationen an Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) zum Medium hinzugegeben. Die HUVECs (s. Abb. 3.11) wiesen in Anwesenheit von diesem Stimulations-

faktor eine etwas höhere PIGF-Expression auf als ohne diesen. Es kam demnach zu einem Konzentrationsanstieg von 0,2 auf 0,3 ng/ml PIGF. Jedoch war mit ansteigender Dosis kein großer Unterschied mehr zu erkennen.

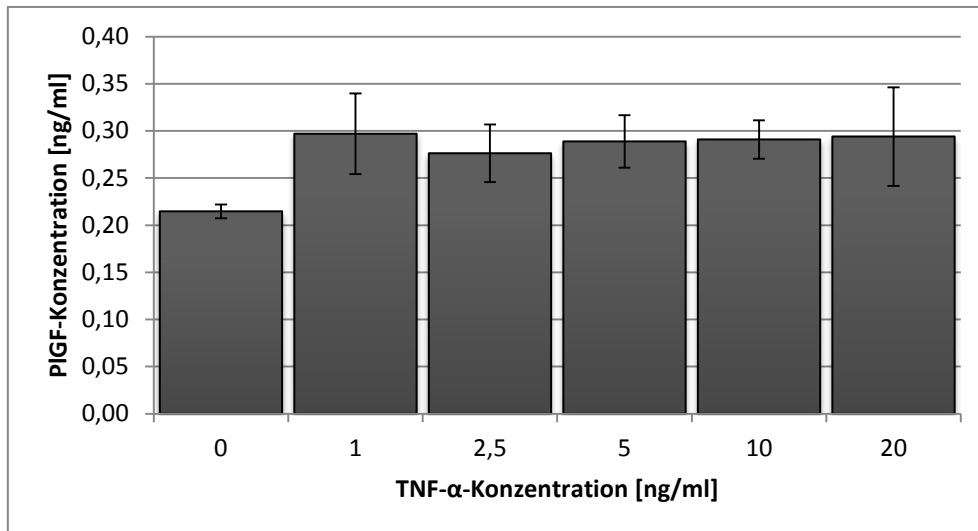


Abb. 3.11 PIGF-Konzentration in Abhängigkeit zur TNF- α -Konzentration. HUVEC, p8 wurden stimuliert mit unterschiedlichen Konzentrationen an TNF- α und es wurde am 3. Tag der Überstand entnommen. Die Balken zeigen die absolute Standardabweichung (σ).

Die Stimulation der SNO-MECs zeigte einen eindeutigen Anstieg der PIGF-Konzentration mit ansteigendem TNF- α -Gehalt im Medium (s. Abb. 3.12).

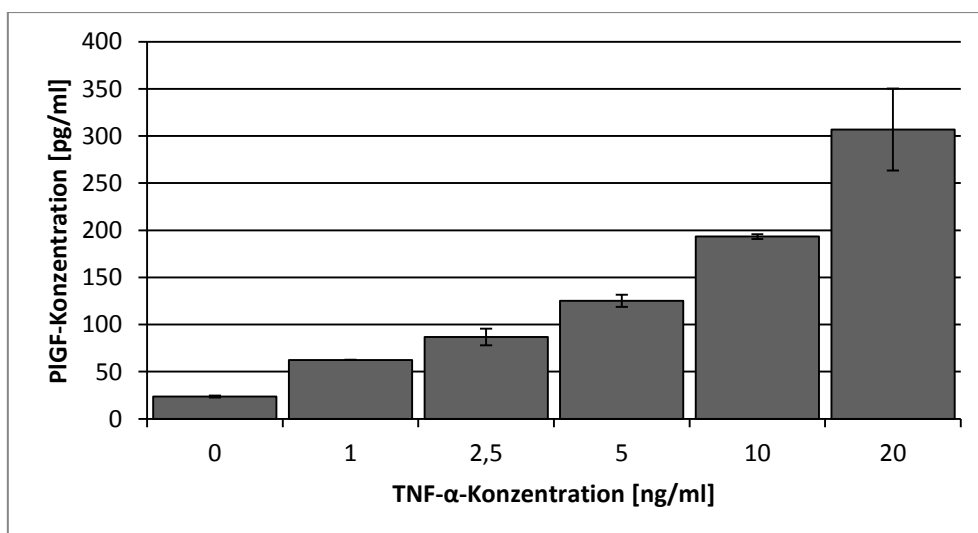


Abb. 3.12 PIGF-Konzentration in Abhängigkeit zur TNF- α -Konzentration. SNO-MEC C9 Subklone, p79 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an TNF- α stimuliert und es wurde am 3. Tag der Überstand entnommen. Die Balken zeigen die absolute Standardabweichung (σ).

Ohne diesen Faktor sezernierten die Zellen 23 pg/ml PIGF, mit 1 ng/ml TNF- α bereits ca. 62 pg/ml und bei einer TNF- α -Konzentration von 20 ng/ml konnten Konzentrationswerte des Wachstumsfaktors von ca. 300 pg/ml detektiert werden, was einem 13-fachen Anstieg der Konzentration entspricht.

3.4.3 Konzentrationsabhängige Stimulation mit FCS

Fetales Kälberserum (FCS) war einer der Hauptbestandteile der eingesetzten Nährmedien, sowohl für HUVECs als auch für SNO-MECs. Da in FCS eine Vielzahl von Proteinen und Wachstumsfaktoren enthalten sind, welche Einfluss auf die PIGF-Expression haben könnten, wurden die Zellen ohne FCS und mit unterschiedlichen Konzentrationen im Medium kultiviert. Anschließend wurden die Konzentrationsänderungen von PIGF mittels ELISA untersucht.

Bei der Stimulation der HUVECs war zu sehen, dass die Zellen ohne FCS im Vergleich zu Ansätzen mit FCS sehr hohe Konzentrationen an PIGF ausschütteten (s. Abb. 3.13). Mikroskopische Beobachtungen zeigten in diesem Zusammenhang, dass die Zellen ohne FCS sehr wenig bis gar nicht an dem Boden des Zellkulturgefäßes adhärten. Bei einer Konzentration ab 5% FCS im Medium war eine gute Anheftung der Zellen zu beobachten. Die PIGF-Konzentration bei dieser Konzentration an FCS fiel auf ein Viertel ab. Es war ein Konzentrationsunterschied von 0,8 ng/ml auf 0,2 ng/ml sichtbar.

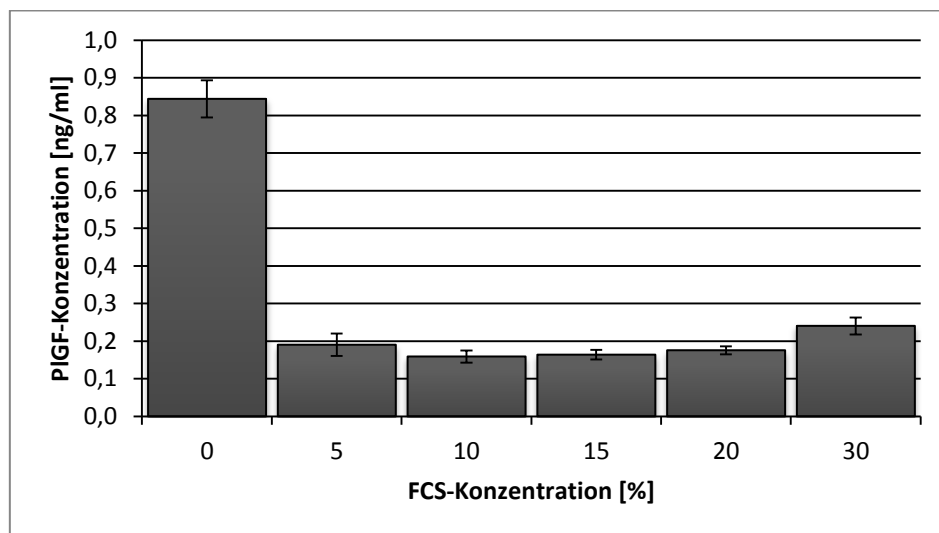


Abb. 3.13 PIGF-Konzentration in Abhängigkeit zur FCS-Konzentration. HUVEC, p9 wurden stimuliert mit unterschiedlichen Konzentrationen an FCS und es wurde am 3. Tag der Überstand entnommen. Die Balken zeigen die absolute Standardabweichung (σ).

Wie zu erwarten, konnte dieses Ergebnis mit den SNO-MEC C9 Subklonen bestätigt werden. Bei einer Kultivierung ohne FCS konnten PIGF-Konzentrationen von 1,066 ng/ml nachgewiesen werden. Mit ansteigender FCS-Konzentration war ein Abfall des PIGF-Gehalts im Überstand zu verzeichnen (s.

Abb. 3.14). Bei einem Zusatz von 5% FCS im Medium konnte nur ein Fünftel der PIGF-Konzentration im Vergleich zum Zusatz von 0% FCS nachgewiesen werden. In Gleicherweise zeigten die murinen Endothelzellen bei einer Kultivierung ohne FCS keine Anheftung am Zellkulturboden.

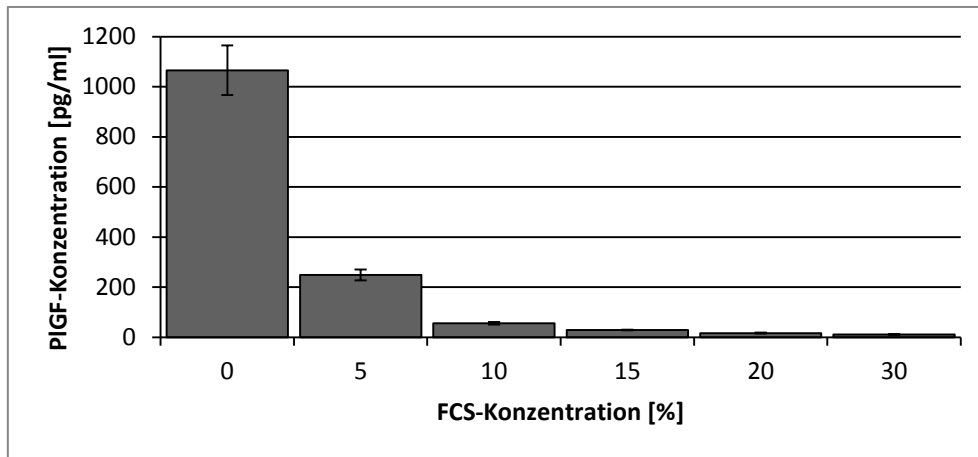


Abb. 3.14 PIGF-Konzentration in Abhängigkeit zur FCS-Konzentration. SNO-MEC C9 Subklone, p79 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an FCS stimuliert und es wurde am 3. Tag der Überstand entnommen. Die Balken zeigen die absolute Standardabweichung (σ).

3.4.4 Konzentrationsabhängige Stimulation muriner Endothelzellen mit ECGF

ECGF (*Endothelial cell growth factor*) ist ein für das optimale Wachstum muriner Endothelzellen wichtiger Bestandteil des Nährmediums. Im Normalmedium war dieser mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ enthalten.

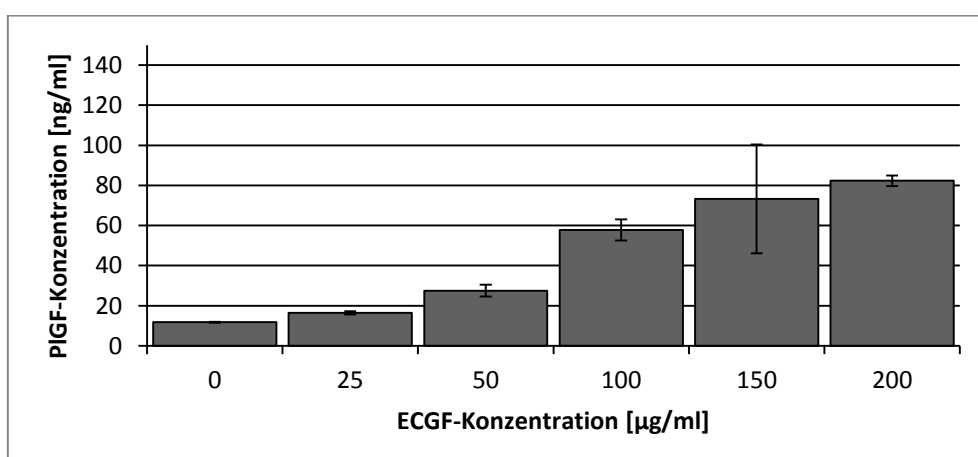


Abb. 3.15 PIGF-Konzentration in Abhängigkeit zur ECGF-Konzentration. SNO-MEC C9 Subklone, p79 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an ECGF stimuliert und es wurde am 4. Tag der Überstand entnommen. Die Balken zeigen die absolute Standardabweichung (σ) um

Bei mikroskopischer Beobachtung des Zellwachstums war zu erkennen, dass die Endothelzellen mit einer ECGF-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ nach drei Tagen eine höhere Zelldichte aufwiesen als ohne ECGF. In Abb. 3.15 ist zu erkennen, dass die PlGF-Konzentration mit höher werdendem ECGF-Anteil im Medium steigt. Dieses Ergebnis bestätigt sich ebenfalls durch die zunehmende Zelldichte bei steigender PlGF-Konzentration.

3.4.5 Konzentrationsabhängige Stimualtion humaner Endothelzellen mit ECGS

ECGS (*endothelial cell growth supplement*) ist ähnlich wie ECGF für murine Endothelzellen ein wichtiger Bestandteil des Nährmediums humaner Endothelzellen. Mit ansteigender ECGS-Konzentration war in den Überständen ebenfalls eine erhöhte PlGF-Expression zu erkennen (s. Abb. 3.16). Da es auch in diesem Fall mit steigendem ECGS-Gehalt im Medium zu einer erhöhten Zelldichte kam, ist ein Zusammenhang der Zelldichte mit der PlGF-Konzentration zu vermuten.

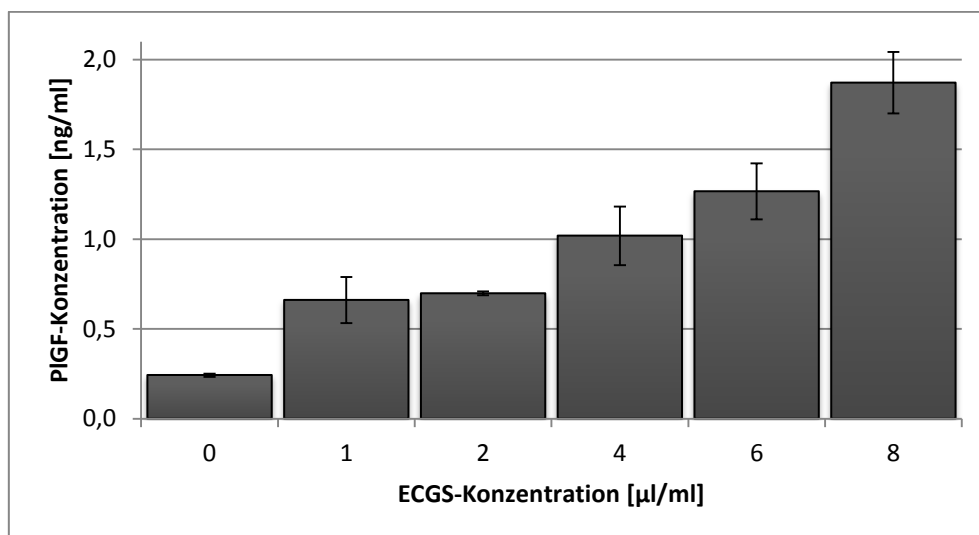


Abb. 3.16 PlGF-Konzentration in Abhängigkeit zur ECGS-Konzentration. HUVEC, p9 wurden stimuliert mit unterschiedlichen Konzentrationen an ECGS und es wurde am 3. Tag der Überstand entnommen. Die Balken zeigen die absolute Standardabweichung (σ).

4 DISKUSSION

Der *placental growth factor* (PlGF) zählt zur Gruppe der VEGF-Liganden und es ist anzunehmen, dass er somit auch eine entscheidende Rolle in der Angiogenese und Vaskulogenese spielt. Forschungsergebnisse die sich mit der *in vivo* Funktion von PlGF beschäftigten zeigten jedoch, dass PlGF^{-/-} Mäuse eine normale Embryonalentwicklung durchlaufen (Carmeliet, 2001), während das Fehlen eines einzelnen VEGF Allels fatale vaskuläre Defekte verursacht (Carmeliet et al., 1996).

Da in vielen anderen Studien der Einfluss von PlGF auf die Gefäßproliferation und -migration nachgewiesen wurde, ist wahrscheinlich davon auszugehen, dass beim Fehlen von PlGF dessen Funktion von anderen Wachstumsfaktoren übernommen wird. Daraus lässt sich schlussfolgernd sagen, dass PlGF im Vergleich zu VEGF eine untergeordnetere Rolle spielt.

Interessant ist außerdem, dass PlGF in der Lage ist, die *in vitro* und *in vivo* sezernierte Menge von VEGF zu modulieren und zu potenzieren (Carmeliet, 2001). Die Beeinflussung und Kontrolle von VEGF könnte somit eine entscheidende Aufgabe von PlGF sein. So belegte eine Studie von Bottomley et al. (Bottomley et al., 2000), dass PlGF an Monozyten die verstärkte Induktion von Wachstumsfaktoren auslösen kann. Hierbei wurde die VEGF Sekretion von Monozyten in der Synovialflüssigkeit von Patienten untersucht, die unter rheumatoider Arthritis leiden. Dabei wurde entdeckt, dass die Stärke der PlGF-Stimulation, also die Höhe des PlGF Spiegels, eine entscheidende Rolle spielt.

Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich speziell mit der Regulation und Expression des PlGF-Proteins und kann somit neue Erkenntnisse über das *in vitro* Verhalten dieses Wachstumsfaktors liefern.

4.1 Vergleich der PlGF-Expressionsrate zwischen Synzytiotrophoblasten der Plazenta und humanen Endothelzellen

Die Quantifizierung der PlGF-Expressionsrate in der Plazenta, sowie in Endothelzellen mit Hilfe des Sandwich-ELISAs zeigte, bezogen auf die Gesamtkonzentration, keine auffälligen Unterschiede. Beachtet man jedoch, dass PlGF in der Plazenta ausschließlich von Synzytiotrophoblasten sezerniert wird, so ist beim Fokus auf diesen Zelltyp eine Differenz zur Expressionsmenge in Endothelzellen erkennbar.

Der Anteil an Synzytiotrophoblasten in der Plazenta entspricht, hervorgehend aus deren Aufbau, einem Anteil von maximal 50%. Demzufolge ist zu erwarten, dass die PlGF-Expressionsmenge bei Endothelzellen um mehr als 50% geringer als in Synzytiotrophoblasten.

Genaue Gründe für die hohe Expression dieser Zellen sind noch immer unklar. Bisher wurde angenommen, dass PlGF das Trophoblastenwachstum und die -differenzierung kontrolliere, d.h. in die

Gefäßentwicklung der Plazenta involviert sei (Maglione et al., 1991). Nach Beobachtungen der normalen Entwicklung von PIGF^{-/-} Mäusen (Carmeliet, 2001) muss diese Ansicht jedoch bezweifelt werden.

4.2 Vergleich der PIGF-Expressionsrate zwischen humanen und murinen Endothelzellen

Da in dieser Arbeit die Regulation des PIGF-Proteins untersucht werden sollte, ist *in vitro* mit Endothelzellen gearbeitet worden. Erstmals wurde ein Vergleich zwischen humanen und murinen Endothelzellen hergestellt.

Im Allgemeinen ist zur PIGF-Expression in murinen Endothelzellen bisher weniger bekannt als zu humanen, aber es ist davon auszugehen, dass das Stimulationsverhalten der murinen Zellen ähnlich verläuft wie das Verhalten der humanen Endothelzellen.

Georg Richter (Richter, 2008) zeigte in PCR-Ergebnissen auf mRNA-Basis, dass murine Endothelioma und SNO-MECs das PIGF-Gen exprimieren. Durch eigene Experimente konnte nachgewiesen werden, dass die Endothelioma C57Bl/6 keine Expression des Proteins aufwies, da das transkribierende PIGF-Gen vermutlich nicht aktiv oder in einer Intron-Region lokalisiert ist. Parallel hierzu konnte jedoch eine PIGF-Expression in SNO-MECs detektiert werden, so dass keine weiteren Endothelioma in Kultur genommen wurden.

Da die PIGF-Expression der kultivierten SNO-MEC Primärkultur nur sehr geringe Werte aufwies, wurden Subklone dieses Zelltyps analysiert. Subklone sind vereinzelte und weiter kultivierte Zellen einer Primärkultur. In einer Primärkultur ist es möglich, dass jede Zelle ein Gen in anderer Form aktiv geschaltet hat, wogegen die Zellen einer Subklon-Kultur ein bestimmtes Gen in gleicher Form exprimieren sollten. Demnach war es möglich, einen Subklon zu detektieren, welcher eine signifikant höhere PIGF-Expression aufwies als der Durchschnitt der Primärkultur.

Die detektierten SNO-MEC C9 Subklone sezernierten PIGF-Mengen im pg-Bereich. Im Vergleich dazu sezernieren die *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) deutlich höhere PIGF-Mengen im ng-Bereich.

Das bedeutet, dass in Mäusen geringere Konzentrationen an PIGF für die Angiogenese benötigt werden oder der murine Sandwich-ELISA ausschließlich unkomplexiertes PIGF erfasst. Falls der murine Sandwich-ELISA komplexiertes PIGF tatsächlich nicht erfassen sollte, so wäre es möglich, dass die Endothelioma, welche anscheinend kein PIGF exprimieren, dies nur in komplexierter Form im Überstand vorliegen haben.

4.3 Einfluss von ECGF/ECGS auf die PlGF-Expressionsrate

Der *endothelial cell growth factor* (ECGF) und das *endothelial cell growth supplement* (ECGS) sind wichtige Bestandteile des endothelialen Kulturmediums, durch dessen Zusatz ein besseres Zellwachstum ermöglicht wird.

Mit steigender Zellzahl erhöht sich in der Regel die Menge vom sezernierten PlGF im Medium. Die Ergebnisse dieser Bachelorarbeit zeigen, dass die PlGF-Sekretion mit vermehrter ECGF/ECGS-Konzentration im Medium ebenfalls ansteigt. Dies wird wahrscheinlich durch verstärktes Zellwachstum und Zellteilung hervorgerufen. Bekannt ist, dass der *fibroblast growth factor* (FGF)-1/2 das Zellwachstum von Endothelzellen stimuliert. Es ist allerdings möglich, dass in ECGF/ECGS noch andere Bestandteile als der FGF-1/2 für die Induktion von PlGF mitverantwortlich sind.

4.4 Einfluss der PKC-Aktivierung durch PMA auf die PlGF-Expression

PMA, welches strukturähnlich zu dem zelleigenem PKC-Regulator Diacylglycerol (DAG) in humanen Endothelzellen aufgebaut ist, kann an der Bindungsstelle für DAG binden und somit die PKC-Aktivität erhöhen. Eine Erhöhung der PKC-Aktivität durch den Phorbolester PMA führt in HUVECs, nachgewiesen von Funasaka et al. (Funasaka et al., 2002) und Hornig et al. (Hornig et al., 2000), zu einer Steigerung der VEGFR-1-Expression. Da VEGFR-1 den wichtigsten natürlichen Rezeptor für PlGF darstellt, folgte die Vermutung, dass die Aktivierung der PKC-Kaskade auch Auswirkung auf die PlGF-Expression zeigt. Bereits Bernhard Barleon (Barleon, 1994) ging dieser Fragestellung nach und stellte fest, dass PMA die PlGF-Expression signifikant induziert. In den aktuellen Ergebnissen dieser Arbeit konnte diese Aussage jedoch nicht bestätigt werden.

Nach erfolgreicher Aktivierung der PKC in den HUVEC und SNO-MEC Endothelzellen ist keine Induktion des Gens erkennbar. Die HUVECs zeigen bei einer Stimulation mit 20 ng/ml PMA bei fortschreitender Zeit keinen Anstieg der PlGF-Konzentration im Überstand. Verglichen mit einer normalen Zeitkinetik ist auf eine Inhibierung zu schlussfolgern. In einem weiteren Versuch ist die PlGF-Konzentration nach dreitägiger Stimulation mit unterschiedlichen PMA-Gehältern untersucht worden. Hierbei ist mit 5 ng/ml PMA eine etwas höhere PlGF-Expression als ohne PMA zu erkennen, jedoch ist hierbei nicht von einer Induktion durch PMA auszugehen, da mit fortschreitender Zeit eine Inhibierung der PlGF-Expression zu verzeichnen ist. Für ein eindeutiges Ergebnis hätte die Stimulation womöglich für einen längeren Zeitraum stattfinden müssen.

Bernhard Barleon untersuchte diese Fragestellung auf RNA Ebene mit Hilfe von Northern Blots. Sollten seine Aussagen zutreffen, bedeutet dies, dass PlGF exprimiert wird, welches nicht dem in dieser Arbeit verwendeten ELISA nachweisbar war. Dies könnte entweder daran liegen, dass PlGF an einen membranständigen VEGFR-1 Rezeptor gebunden ist und somit, da es an den Zellen haftet, nicht im

Überstand vorhanden ist. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass PIGF mit dem löslichen sVEGFR-1 komplexiert ist, wodurch aufgrund sterischer Effekte eine Blockierung der Antikörperbindung erfolgt.

Auf murine Endothelzellen (SNO-MECs) zeigt PMA weder einen induzierenden noch einen inhibierenden Effekt. Dies könnte bedeuten, dass es nicht möglich ist die PKC-Kaskade in murinen Zellen durch PMA zu aktivieren oder die Aktivierung dieser Kaskade keinen Effekt auf die PIGF-Expression zeigt.

4.5 Abhängigkeit der PIGF-Expression von TNF- α

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wird vermehrt bei Entzündungsvorgängen sezerniert. Somit kann bei einem stimulierenden Effekt bei der PIGF-Expression in Abhängigkeit von TNF- α von einem Einfluss von PIGF bei Entzündungsvorgängen ausgegangen werden.

Bernhard Barleon (Barleon, 1994) beschrieb in seiner Dissertation eine Inhibierung der PIGF-Expression durch TNF- α auf RNA-Ebene. Dieses Ergebnis konnte in durchgeführten Versuchen der vorliegenden Arbeit widerlegt werden. In humanen Endothelzellen scheint TNF- α keine stimulierende oder inhibierende Wirkung zu besitzen. SNO-MECs Endothelzellen zeigten hingegen bei Stimulation mit TNF- α eine induzierte Expression des PIGF-Proteins. Daraus kann geschlossen werden, dass in der Maus TNF- α eine größere Rolle bei der Ausschüttung von PIGF während Entzündungsvorgängen spielt als im humanen Organismus. Weiterhin könnte vermutet werden, dass in humanen Endothelzellen eine ebenfalls verstärkte PIGF-Sekretion durch Zusammenwirken von TNF- α und anderen, für Entzündungsvorgänge typische Zytokine, wie IL-6, hervorgerufen werden kann.

4.6 Inhibierung der PIGF-Expression durch FCS

FCS (*fetal calf serum*) ist ein wichtiger Bestandteil des Nährmediums humaner und muriner Endothelzellen. Durch das Fehlen von FCS sind die Zellen *in vitro* kaum zur Vermehrung und Adhärenz in der Lage.

Für dieses Experiment sind humane und murine Endothelzellen einmal ohne und mit ansteigenden Konzentrationen an FCS behandelt worden. Die Zellen ohne FCS zeigten wie vermutet wenig Zellwachstum und kaum Adhärenz. Vor der Messung der PIGF-Konzentration wurde erwartet, dass die Zellen ohne FCS eine sehr geringe PIGF-Expression zeigen, da in der FCS-freien Kultur kaum Endothelzellen vorhanden waren. Überraschend wiesen aber genau diese Zellen eine sehr hohe PIGF-Konzentration im Überstand auf. Es ist naheliegend, dass die fehlende Adhärenz und das damit verbundene Absterben der Endothelzellen eine Rolle für die vermehrte PIGF-Expression spielen. Gerber et al. (Gerber et al., 1998) stellte fest, dass VEGF neben der Proliferationsstimulation von Endothel-

zellen auch deren Apoptose einschränkt. Möglicherweise trifft dies auch auf PlGF zu, indem die Expression von PlGF über ähnliche Signalwege wie VEGF zur Verhinderung des Zelltodes gesteuert wird. Bei den murinen Endothelzellen war mit anteiligem FCS-Gehalt weiterhin ein Abfall in der PlGF-Konzentration zu verzeichnen, obwohl eine Adhärenz ab einem FCS-Gehalt von 5% gewährleistet war und das Absterben der Zellen somit keine Begründung mehr darstellt.

Die Bestandteile von FCS sind nicht genau bekannt, könnten jedoch ein Grund für die geringere PlGF-Expression in Anwesenheit von FCS sein. Wenn FCS beispielsweise hohe Konzentrationen des löslichen sFlt-1 Rezeptors beinhaltet, würde sFlt-1 an PlGF binden und dieses somit eventuell sterisch blockieren, so dass ELISA-Antikörper nicht binden können. Ebenfalls könnten andere noch unbekannte FCS-Bestandteile die Gen-Expression von PlGF inhibieren.

Zur Aufklärung ob die fehlende Adhärenz eine Rolle in dieser Stimulation spielt, ist es sinnvoll weitere PlGF-ELISA Messungen, in Überständen von Zellen, welche in Medium ohne FCS, das jedoch ein Zellwachstum und Adhärenz der Zellen ermöglicht (z.B. definiertes Endothelial Cell Medium, PAA), durchzuführen.

4.7 Ausblick

In sich anschließenden Forschungsprojekten sollte geklärt werden, ob der murine Sandwich-ELISA sowohl freies als auch komplexiertes PlGF mit seinem löslichen sFlt-1 Rezeptor erkennt. Hierzu könnte sFlt-1 künstlich hinzu gegeben werden und die anschließend ermittelten Werte mit den Werten ohne diesen Rezeptor verglichen werden.

Wenn bewiesen ist, ob dieser Assay PlGF in komplexierter Form mit sFlt-1 erkennt oder nicht, so können auch genauere Aussagen zur PKC abhängigen PlGF-Expression von murinen Endothelzellen getroffen werden.

In Hinblick auf ECGF wäre herauszufinden, ob FGF-1 bzw. FGF-2 für die Induktion der PlGF-Expression verantwortlich sind oder andere noch unbekannte Bestandteile im ECGF.

Da TNF- α in murinen Endothelzellen zu einer Induktion der PlGF-Sekretion führt, sollte für humane Endothelzellen das Stimulationsverhalten bei Entzündungsvorgängen genauer untersucht werden. Das kann beispielsweise durch die Zugabe weiterer entzündungsspezifischer Zytokine, wie Interleukin-6 (IL-6), bewirkt werden.

Gegen Ende dieser Forschungsarbeit konnten sehr interessante Ergebnisse bezüglich der Regulation der PlGF-Sekretion mittels FCS beobachtet werden. Die Fragestellung, wodurch der Anstieg der PlGF-Konzentration im Überstand ohne FCS zustande kommt, konnte leider nichtmehr analysiert werden. Demnach ist es sinnvoll, eine Untersuchung zur bestehenden sFlt-1 Konzentration in FCS durchzuführen. Weiterhin sollte man die Zellen in z.B. definiertem Endothelial Cell Medium von PAA kultivie-

ren, indem den Zellen ein Wachstum ermöglicht wird, um so auf einen Zusammenhang der PlGF-Expression mit der Vitalität der Zellen zu schlussfolgern zu können bzw. diesen auszuschließen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Es ist bekannt, dass der *placental growth factor* (PlGF) in hohen Konzentrationen in der Plazenta sowie von Endothelzellen sezerniert wird. Die genaue Funktion dieses Wachstumsfaktors ist bis heute jedoch nicht genau bekannt. In der vorliegenden Arbeit werden die quantitativen Expressionswerte von PlGF in der Plazenta und von Endothelzellen ermittelt, sowie Aufschlüsse zu dessen Regulation und Stimulation geliefert.

Methoden: Für die Ermittlung der PlGF Konzentration in der Plazenta sowie in Endothelzellen sind Zell- und Gewebe-Lysate angefertigt worden, um diese anschließend im Sandwich ELISA und Western Blot zu untersuchen. Alle weiteren quantitativen Proteinbestimmungen wurden ebenfalls mit diesem Assay durchgeführt. Für die Stimulationsversuche wurden humane (HUVEC) und murine (SNO-MEC) Endothelzellen kultiviert, mit den Stimulationsfaktoren PMA, TNF- α , FCS, ECGF und ECGS behandelt und deren Überstände anschließend im ELISA untersucht. Teilweise sind weitere qualitative Bestimmungen zur Expression des Gens mittels PCR realisiert worden. Dazu wurde RNA aus den Zellen isoliert und cDNA synthetisiert.

Ergebnisse: Es ist gelungen, den Wachstumsfaktor PlGF qualitativ und quantitativ in der Plazenta sowie in Endothelzellen zu erfassen. Weiterhin konnte ein inhibierender Zusammenhang der durch PMA gesteuerten PKC-Aktivierung festgestellt werden. ECGF und ECGS bewirken einen Anstieg der Zelldichte sowie eine erhöhte Sezernierung von PlGF. Mit TNF- α konnte in murinen Endothelzellen ebenfalls eine Induktion erreicht werden. Eine wichtige Erkenntnis war, dass FCS im Zellkulturmedium inhibierend auf die PlGF-Expression wirkt, da der Zusammenhang der PlGF-Expression mit FCS in dieser Arbeit erstmals aufgestellt wurde.

LITERATURVERZEICHNIS

BÜCHER:

- Cochard, L.R.; Netter, F.; Craig, J.A. (2002): Netter's Atlas of Human Embryology. – 1. Aufl. - Icon Learning Systems
- Glick, B. R. / Pasternak, J. J. (1995): Molekulare Biotechnologie. – 1. Aufl. – Heidelberg, Berlin, Oxford: Akademischer Verlag
- Mülhardt, C. (2006): Molekularbiologie/Genomics. – 5. Aufl. – München: Spektrum Akademischer Verlag
- Nicholl, D. S. T. (1995): Gentechnische Methoden. – 1. Aufl. – Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag
- Raem, A.M.; Rauch, P. (2007): Immunoassays. – 1. Aufl. – München: Spektrum Akademischer Verlag
- Rehm, H. / Letzel T. (2010): Der Experimentator – Proteinbiochemie/Proteomics. – 6. Aufl. - Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Wink, M. (2004): Molekulare Biotechnologie – Konzepte und Methoden. – 1. Aufl. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag

FACHARTIKEL:

- Ahmed, A.; Dunk, C.; Ahmad S.; Khaliq, A. (2000): Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen – a review. Amsterdam: Placenta, 21, S. 16-24
- Cao, Y.; Ji, W.R.; Qi, P.; Rosin, A.; Cao, Y. (1997): Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. Biochemical and biophysical research communications – Amsterdam: Elsevier, 235, S. 493-498
- Carmeliet, P. (2001): Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. Nature medicine – USA: Nature Publishing Company, 7, S. 575-583
- Carmeliet, P.; Ferreira, V.; Breier, G.; Pollefeyt, S.; Kieckens, L.; Gertsenstein, M.; Fahrig, M.; Vandenhoek, A.; Harpal, K.; Eberhardt, C.; Declercq, C.; Pawling, J.; Moons, L.; Collen, D.; Risau,

- W.; Nagy, A. (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature – England: Nature Publishing Group*, 6573, 380, S. 435-439
- Carmeliet, Peter (2007): Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature. – Philadelphia: Nature Publishing Group*, 435, 12, S. 932-936
- De Falco, S.; Gigante, B.; Persico, MG. (2002): Structure and function of placental growth factor. *Trends in cardiovascular medicine – New York: Elsevier Science Publishing*, 12, 6, S. 241-306
- Folkman, J. / Shing, Y. (1992): Angiogenesis. *The Journal of biological chemistry – USA: American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 267, 16, S. 10931-10934
- Hauser, S. / Weich H. (1993): A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors - Chur, Switzerland: Informa Healthcare*, 9, 4, S. 259-268
- Holm, M.; Lehmann, F.; Laufer, S. (2008): Medizinische Chemie und molekulare Hemmmechanismen der Tyrosinkinase-Inhibitoren. *Pharmazie unserer Zeit – Weinheim: Wiley-VCH Verlag*, 37, 5, S. 382-392
- Hornig, C.; Barleon, B; Ahmad, S.; Vuorela, P.; Ahmed, A.; Weich, H. (2000): Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids. *Laboratory Investigation – USA: Nature Publishing Group*, 80, 4, S. 443-454
- Huppertz, B. / Herrler, A. (2005): Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews – USA: Wiley-Liss*, 75, 4, S. 249-261
- Maglione, D.; Guerriero, V.; Viglietto, G.; Delli-Bovi, P.; Persico, M.G. (1991): Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – USA: National Academy of Sciences*, 88, 20, S. 9267-9271
- Mross, Klaus (2008): Inhibition des VEGF-Rezeptorsystems mit Tyrosinkinase-Inhibitoren. In: *Pharmazie unserer Zeit. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag*, 37, 5, S. 404-415
- Nishizuka, Y. (1984): The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature – England: Nature Publishing Group*, 5961, 308, S. 693-708

- Persico, M.G.; Vincenti, V.; DiPalma, T. (1999): Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Current topics in microbiology and immunology* – Berlin: Springer Verlag, 237, S. 31-40
- Yang, W.; Ahn, H.; Hinrichs, M.; Torry, R.J.; Torry, D.S. (2003): Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *Journal of reproductive immunology* – Irland: Elsevier, 60, 1, S. 53-60
- Ziche, M.; Maglione, D.; Ribatti, D.; Morbidelli, L.; Lago, C. T.; Battisti, M.; Paoletti, I.; Barra, A.; Tucci, M.; Parise, G.; Vincenti, V.; Granger, H.J.; Viglietto, G.; Persico, M.G. (1997): Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Laboratory Investigation* – USA: Lippincott Williams & Wilkins, 76, 4, S. 517-531
- Funasaka, T.; Haga, A.; Raz, A.; Nagasa, H. (2002): Autocrine motility factor secreted by tumor cells upregulates vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) Expression in endothelial cells. *International Journal Cancer* - USA, 101, 6, S. 217-223
- Gerber, H.P.; McMurtrey, A.; Kowalski, J.; Yan, M.; Keyt, B.A.; Dixit, V.; Ferrara, N. (1998): Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of biological chemistry* – USA, 273, S. 30336-30343

ABSCHLUSSARBEITEN/ DISSERTATIONEN:

- Barleon, Bernhard (1994): Molekulare und zelluläre Charakterisierung der VEGF-Rezeptoren flt-1 und KDR: Differentielle Regulation der Genexpression. Dissertation – Freiburg, Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität
- Berse, Mathias (2005): Regulation der Stabilität der proangiogenen Transkriptionsfaktoren c-Jun, Id1 und Id3 durch das COP9-Signalosom. – Dissertation – Berlin, Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Medizinischen Fakultät der Charité
- Hauser, Stefanie (1992): Placental Growth Factor (PlGF₁₄₉ und PlGF₁₇₀): Klonierung mit Hilfe der PCR-Technik und Studien zur Genexpression. Diplomarbeit – Braunschweig, TU Braunschweig
- Richter, Georg (2008): Charakterisierung muriner Lymphendothelzellen durch Späroidbasierende *in vitro*-Angiogenese. Bachelorarbeit – Braunschweig, Technische Universität

Volkmann, Bettina (2004): Induktion von vaskulo-endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF) durch *Bartonella henselae*. – Diplomarbeit. – München, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Kubisch, Elke (2007): Regulation der Flt-1/VEGFR-1 Genexpression via Modulation der Hypoxie und PKC-Aktivierung *in vitro*. – Diplomarbeit. – Emden, Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/ Wilhelmshaven

INTERNET

http://www.activemotif.com/images/products/functionelisa_sandwich.jpg

<http://www.nymphenburger-gymnasium.de/gkbio/gentech/gentech.html>

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Herbert Weich für die Überlassung des spannenden Themas, seine ausgezeichnete Betreuung, die zahlreichen Ideen und Denkanstöße, sowie seiner Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wünschiers für die unkomplizierte Betreuung seitens der FH.

Auch Brigitte Pawletta gilt ein Dank für die nützlichen Ratschläge und die angenehmen Stunden im Labor.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe und der Forschungsabteilung für die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Ich möchte nicht versäumen einen Dank meiner Familie und meinen Freunden für die finanzielle und mentale Unterstützung während der gesamten Arbeit auszusprechen.